



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS**

**SELÊNIO E AFLATOXINAS EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia
excelsa* H.B.K.) E QUALIDADE DE PRODUTOS DERIVADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Ph.D. Vildes Maria Scussel, UFSC

Ariane Mendonça Pacheco

Florianópolis, 2007

Ariane Mendonça Pacheco

**SELÊNIO E AFLATOXINAS EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia
excelsa* H.B.K.) E QUALIDADE DE PRODUTOS DERIVADOS**

Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Ph.D. Vildes Maria Scussel, UFSC

Florianópolis, 2007.

Pacheco, Ariane Mendonça
SELÊNIO E AFLATOXINAS EM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia
excelsa* H.B.K.) E QUALIDADE DE PRODUTOS DERIVADOS / Ariane
Mendonça Pacheco; orientadora, Vildes Maria Scussel. - Florianópolis, 2007.
144 p. : il.; graf.; fig.; 29 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de
Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, 2007.

Inclui bibliografia

1. Castanha-do-Pará – Amazonas 2. Qualidade 3. Alimentos –
Contaminação 3. Aflatoxina 4. Fungos – Patogenicidade I. Scussel, Vildes
Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciências dos Alimentos. III. Título

CDU (1997): 634.575 (811.3)

Catálogo na fonte por: Maria Siméia Ale Girão CRB-11ª 284

Agradeço a DEUS por sua graça e dedico aos meus pais, Ozéas e Lucilene e aos meus amores, Neuzimar e Daniel. Obrigada pelo amor incondicional.

Agradecimentos

- À Dra. Vildes M. Scussel, pela oportunidade e atenção.
- Aos Doutores: Edna R. Amante, Elane S. Prudêncio e Pedro L. M. Barreto (UFSC); Ana Cyra dos S. Lucas, José M. Chaar e Henrique dos S. Pereira (UFAM); Ormezinda C. C. Fernandes (FIOCRUZ) pela amizade, apoio, incentivo e sugestões;
- Aos funcionários e colegas do programa de ciências de alimentos da UFSC, pelas sugestões, amizade e disponibilidade.
- À Equipe do Laboratório Nutricon, pelo suporte e auxílio nas coletas e análises.
- À Equipe do LABMICO, pela amizade e apoio técnico.
- À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas, pelo suporte financeiro.
- Aos amigos Fernanda e Marcelo, pelo carinho.
- À amiga Maria Katherine, pelo incentivo e por partilhar os mesmos ideais amazônicos.
- Aos extrativistas das comunidades, por viabilizarem as coletas e acesso à informação.
- Aos Senhores Frank e Davis Benzecry, e todos os funcionários da Empresa CIEX, por apoiarem o trabalho.
- Aos amigos, familiares, instituições e “castanheiros” que, direta ou indiretamente, auxiliaram este trabalho, incentivando-me a persistir na intenção maior de fornecer subsídios científicos para que a castanheira continue *EXCELSA*.

**“...Deus é FIEL...”
II Corintios 10:13b**

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Castanha-do-Brasil.....	16
2.1.1 Distribuição geográfica.....	19
2.1.2 Composição nutricional	21
2.1.3 Cadeia produtiva da castanha-do-Brasil.....	29
2.1.4 Produtos derivados da castanha-do-Brasil.....	34
2.1.5 Qualidade da castanha-do-Brasil.....	35
2.2 Selênio	37
2.2.1 Características do selênio.....	37
a) Atividade antioxidante.....	37
b) Toxicidade.....	38
2.2.2 Fontes de Selênio em alimentos.....	39
2.2.4 Selênio e castanha-do-Brasil.....	40
2.2.5 Métodos analíticos para Selênio.....	43
2.3 Aflatoxinas.....	44
2.3.1 Introdução.....	44
2.3.2 Toxicidade das aflatoxinas.....	47
2.3.3 Fatores que influenciam a produção de aflatoxinas.....	48
2.3.4 Métodos analíticos para aflatoxinas.....	52
2.3.5 Legislação nacional e internacional para de aflatoxinas.....	53
2.4 Contaminação da castanha-do-Brasil por fungos e aflatoxinas.....	56
2.4.1 Fatores ambientais da região Amazônica versus fungos e aflatoxinas.....	56
2.4.2 Fungos e aflatoxinas em castanha-do-Brasil.....	58
a) Fungos.....	58
b) Aflatoxinas.....	61
2.5.2 A problemática da castanha-do-Brasil, a União Européia e ações para melhorias.....	65
2.6 Referências bibliográficas.....	67

3. ARTIGO

SELENIUM AND AFLATOXINS LEVELS IN RAW BRAZIL NUTS FROM THE EASTER AND WESTERN AMAZON BASIN.....	80
3.1 Abstract.....	81
3.2 Introduction.....	82
3.3 Material and Methods.....	83
3.4 Results and Discussion.....	85
3.5 Literature Cited.....	91

4. ARTIGO

AVALIAÇÃO DE AFLATOXINAS EM CASTANHA-DO-BRASIL TIPO EXPORTAÇÃO DAS SAFRAS 2006 E 2007, POR LC-MS/MS.....	97
4.1 Resumo.....	98
4.2 Introdução.....	99
4.3 Material e Métodos.....	100
4.4 Resultados e Discussão.....	102
4.5 Conclusão.....	107
4.6 Referências.....	108

5. ARTIGO

AFLATOXINAS E OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRODUTOS COM CASTANHA-DO-BRASIL (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.).....	115
5.1 Resumo.....	116
5.2 Introdução.....	117
5.3 Material e Métodos.....	119
5.4 Resultados e Discussão.....	120
5.5 Conclusão.....	122
5.7 Referências.....	123

6. ARTIGO

SELENIUM EFFECT ON FUNGAL PROLIFERATION AND AFLATOXIN PRODUCTION IN BRAZIL NUTS.....	126
6.1 Abstract.....	127
6.2 Introduction.....	128
6.3 Material and Methods.....	129
6.4 Results and Discussion.....	132
6.5 Conclusions.....	134
6.6 Literature Cited.....	134

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	140
ANEXOS	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A castanheira-do-Brasil.....	18
Figura 2. Distribuição da castanheira-do-Brasil entre as regiões (Oeste e Leste) da bacia Amazônica.....	19
Figura 3. Quantidade produzida/extraída de castanha-do-Brasil em municípios do Estado do Amazonas.....	20
Figura 4. Municípios do Estado do Amazonas e atividades relativas à castanha-do- Brasil.....	20
Figura 5. Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil.....	33
Figura 6. Íon molecular protonado de aflatoxina $[M+H]^+$ at [a] m/z 313.1, [b] m/z 315.0, [c] m/z 329.1 e [d] m/z 331 de AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	45
Figura 7. Esquema da formação do composto de ação tóxica a partir da aflatoxina B1....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional básica da Amêndoa de castanha-do-Brasil.....	21
Tabela 2. Parâmetros para qualidade do óleo de castanha-do-Brasil,.....	23
Tabela 3. Composição em ácidos graxos (%) do óleo da castanha-do-Brasil.....	24
Tabela 4. Aminoácidos totais da amêndoa da castanha-do-Brasil.....	25
Tabela 5. Teor de minerais da castanha-do-Brasil.....	26
Tabela 6. Teores de vitaminas presentes na castanha-do-Brasil.....	27
Tabela 7. Antioxidantes e compostos funcionais em castanha-do-Brasil.....	28
Tabela 8. Compostos Radioativos em castanha-do-Brasil.....	29
Tabela 9. Etapas da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil.....	35
Tabela 10. Teor de Selênio em castanha-do-Brasil	41
Tabela 11. Ingestão Diária Aceitável (IDA) de selênio em diversos países.....	42
Tabela 12. Limites máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos em diversos países.....	55
Tabela 13. Ocorrência de danos em castanha-do-Brasil e suas causas.....	57
Tabela 14. Fungos identificados em castanha-do-Brasil in natura e pós-processamento com e sem casca, reportados na literatura.....	60
Tabela 15. Contaminação por aflatoxinas em castanha-do-Brasil.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

AOCS: *Association of Official Chemists Society*

AFLs: aflatoxinas

AFB₁: aflatoxina B₁

AFB₂: aflatoxina B₂

AFG₁: aflatoxina G₁

AFG₂: aflatoxina G₂

Aw: atividade de água

CCD: cromatografia em camada delgada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

cm: centímetros

ETASS: *electrothermal atomic absorption spectrometry*

HACCP: *Hazard analysis and critical control points*

HG-AAS: *hydride generation atomic absorption spectrometry*

HPLC: *high performance liquid chromatography*

ICP: *inductive coupled plasma*

Kg: Kilograma

LC-MS/MS: *liquid chromatography mass/mass*

LOD: *limit of detection*

LOQ: *limit of quantification*

ml: mililiter

MRL: *maximum residual level*

N: normal

nanoHPLC-ES-Q/TOFMS/MS: *inductive coupled plasma assisted nano HPLC, electrospray Q/time-of-flight MS/MS*

nm: nanômetro

ppb: partes por bilhão

ppt: partes por trilhão

RSD: *relative standard deviation*

SD: *standard deviation*

SEC: *size exclusion chromatography*

TLC: *Thin Layer Chromatography*

ton: tonelada

UV: ultravioleta

µg: micrograma

RESUMO

Em algumas áreas Amazônicas, o extrativismo da castanha-do-Brasil é a principal atividade, e após direcionada aos centros de beneficiamento constitui um dos principais produtos de exportação de Estados do Norte do Brasil. Entretanto, devido à diminuição das exportações inclusive por causa de barreiras fitossanitárias impostas aos produtos contaminados por aflatoxinas (AFLs), estudos das possíveis causas de contaminação tornaram-se necessários para auxiliar na manutenção da qualidade. De forma a avaliar a relação entre o teor de Selênio (Se) em amostras de diferentes comunidades da Amazônia brasileira e relacioná-las a presença de AFLs foram coletadas 80 amostras (com casca e descascada). Quando analisadas por espectrometria de emissão atômica e AFL por LC MS/MS, amostras da região Oriental do estado do Amazonas foram maiores tanto no teor de Se quanto de AFLs, do que as da região Ocidental, apesar de não apresentarem diferenças significativas quanto aos níveis de umidade e a_w . Ao testar diferentes teores de Se em meio de cultura e avaliar o comportamento de uma cepa de *Aspergillus flavus* foi evidenciado que com aumento das concentrações (0.01-0.6 mg/kg de Se) o crescimento fúngico foi afetado negativamente. Para identificar os níveis de AFLs em castanha-do-Brasil (Tipo Exportação) utilizou-se o método de LC-MS/MS em 108 amostras com casca e 63 sem casca, coletadas na cidade de Manaus (AM) das safras de 2006 e 2007. Do total, somente 32 (32.3 %) com casca e 45 (62.5 %) descascadas, apresentaram AFLs em que 10 (5.8 %) foram $>4 \text{ ng.g}^{-1}$ (legislação europeia). Considerando o uso de castanha-do-Brasil como ingrediente na obtenção de derivados, 50 amostras de produtos industrializados (snacks, cereais, castanha com chocolate e biscoito) adquiridas em supermercados, foram avaliadas quanto ao nível de dienos e trienos, e associação com AFLs (por LC MS/MS). Do total, 56% atenderam a legislação europeia para AFLs e o maior resultado foi detectado em castanha coberta com média de 4.34 ng.g^{-1} ($0.10\text{-}8.50 \text{ ng.g}^{-1}$). Para dienos e trienos, o maior valor foi observado em castanha descascada ($232\text{nm}/0=0.7450$ e $232\text{nm}/\text{Final}=1.3336$), sendo possível evidenciar a influência da oxidação na deterioração desses produtos. Os resultados dos estudos reforçam a necessidade de aplicação de controles para evitar a produção de AFLs em castanha-do-Brasil, bem como de utilizar as suas características nutricionais contra a deterioração, para promover a qualidade e proteger a saúde do consumidor, com manutenção da atividade extrativa e industrial da castanha-do-Brasil.

Palavras- chaves: *Bertholletia excelsa*, aflatoxinas, *Aspergillus*, Dienos, Trienos

ABSTRACT

The Brazil nut extractivism is the most important commercial activity in some of the Amazon areas and after transported to be processed in the factories it becomes the most important agricultural commodity to some of the northern Brazilian states. Although due to the export decrease of the last years, the aflatoxins (AFLs) were considered as the major cause of contamination and loss of quality. The study of the contamination causes became necessary to support the quality assurance. In order to identify the AFLs levels in Brazil nut for export, the LC-MS/MS method was used in 108 *in-shell* and 63 *shelled* samples, collected in Manaus city (AM) from 2006 e 2007 harvests. From the total, only 32 (32.3 %) *in-shell* and 45 (62.5 %) *shelled*, presented AFL with 10 (5.8 %) $>4 \text{ ng.g}^{-1}$ (European regulation). Considering the Selenium (Se) as an important antioxidant and its relationship to the AFL contamination in Brazil nuts from different Amazon areas, 80 samples (*in shell* and *shelled*) were evaluated. The atomic emission method was used to analyze Se and the LC MSMS for AFL. The eastern Amazon area samples presented higher Se levels and so for AFLs than Western area samples, despite of no significant difference in moisture content and water activity values. During the evaluation of a reference *Aspergillus flavus* strain behavior in media with different Se concentration, was clearly observed as the Se concentration increased (0.01-0.6 mg/kg Se) lower was the fungal growth. As the Brazil nuts are usually taken, broken or entire, as ingredient to other products, 50 samples of industrialized Brazil nut products (snacks, covered nuts, cereal and cookies), collected in supermarkets, were evaluated concerning the lipid oxidation (conjugated dienes (CD) and trienes(CD)) and their association to AFLs. From the total, 56% were according to the legislation to AFLs ($<4 \text{ ng.g}^{-1}$) and the higher level was observed in covered nuts with mean of 4.34 ng.g^{-1} ($0.10\text{-}8.50 \text{ ng.g}^{-1}$). To CD and CT the higher level was observed in snacks type ($232\text{nm}/0=0.7450$ and $232\text{nm}/\text{Final}=1.3336$) and was possible to visualize the oxidation influence in the products. The results of all the factors studied enforce the necessity of mechanisms to control the fungi proliferation and AFL contamination at the different chain stages, as well as the Brazil nut composition role to be used in order to improve their quality against deterioration, protecting the consumer's health and the maintenance of the Brazil nut extractive and industrial activity.

Key-words: *Bertholletia excelsa*, aflatoxins, *Aspergillus*, Diens, Triens

1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), *in natura* ou processada, é uma importante fonte nutricional cuja segurança necessita ser continuamente monitorada. Seu teor de Selênio (Se) tem despertado grande interesse dos consumidores e para o desenvolvimento de outros produtos. Portanto, há necessidade de explorar o real nível de distribuição das aflatoxinas (AFLs) em castanha-do-Brasil e sua relação com fungos, selênio e contaminação de seus derivados.

Tradicionalmente, a castanha-do-Brasil é obtida por comunidades extrativistas da região Amazônica, transportada para centros de distribuição e então direcionada para o beneficiamento em usinas, nas quais são desidratadas e exportadas com casca ou descascadas, ou ainda direcionadas para comercialização no mercado interno, contudo, em menor escala. Tais atividades envolvem toneladas do produto a cada safra e a ocorrência de contaminações, gerou barreiras não-tarifárias por parte de países importadores, diminuindo as exportações brasileiras para a Comunidade Européia e afetando a produção nas usinas e o trabalho extrativista. Estes fatos têm gerado a necessidade de maior acompanhamento técnico preventivo e de reduzir e controlar as etapas da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil, principalmente, pela presença de AFLs, de forma a atender aos limites máximos exigidos do comércio internacional e proteger a saúde dos consumidores.

A coleta e o processamento da castanha-do-Brasil podem promover condições ideais para a contaminação por AFL devido ocorrer, em grande parte, em ambientes com temperatura e umidade relativa elevada e, ainda, por falta de armazenamento e transporte adequados. Tais condições propiciam meios favoráveis aos fungos toxigênicos, e que metabolizam esses contaminantes, naturalmente hepatotóxicos e carcinogênicos, de forma a tornar o alimento nocivo ao consumidor.

As características nutricionais da castanha-do-Brasil, como o teor de Se, também têm suscitado o questionamento, quanto à influência desse elemento no metabolismo dos fungos e conseqüente produção da toxina. Torna-se necessária ainda, a avaliação da distribuição dos teores de Se na castanha-do-Brasil de diferentes regiões, a contaminação por AFLs, e os mecanismos no beneficiamento

que possam inibir a presença de fungos toxigênicos, tanto nos produtos com casca, como descascados.

Entretanto, devido à promoção do comércio interno da castanha-do-Brasil, inteira e/ou em pedaços, daquelas que não atendem aos mercados estrangeiros, tem havido um maior desenvolvimento de novos produtos derivados da castanha-do-Brasil (ex. biscoitos, cereais e bombons). Desta forma, a deterioração por constituintes lipídicos associada às AFLs é um aspecto também a ser explorado.

Esses estudos são importantes no entendimento do nível de AFLs na castanha-do-Brasil e seus produtos, para que se possam determinar os efeitos biológicos no consumidor e mecanismos e/ou tratamentos tecnológicos que aumentem a segurança da cadeia produtiva. Devido ao exposto, os objetivos do trabalho foram: estudar a ocorrência de selênio, fungos e aflatoxinas em castanha-do-Brasil proveniente da região da Amazônia brasileira, bem como avaliar a qualidade de seus produtos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Castanha-do-Brasil

Pertencente ao grupo das nozes de árvores, a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) foi descrita pela primeira vez em 1808, quando HUMBOLDT e BOMPLAND, e posteriormente KUNTH, denominaram a árvore majestosa presente na Floresta Amazônica (MENNINGER, 1977; NYBG, 2006). O Ministério da Agricultura por meio do Decreto 51209 de 18/09/1961, para efeito de comércio exterior, regulamentou a denominação de Castanha-do-Brasil (BRASIL, 1961).

Outras denominações variam internacionalmente, porém, muitas sempre mantêm sua origem -do Brasil ou -do Pará. No Brasil é chamada também de: castanha-do-Maranhão, castanha-do-Pará, Iniá, Niá, Nhá, Eray, Tocary, Tucá, Turury, Yá e Yuvia, *almendras*, *noce del Brasile*, *paranuss*, *Brazil nuts*, *Para nuts*, *Nigger To*, *noix du Bresil*, *noix du Para*, *chataigne du Bresil* e *nuez de Brazil*.

A classificação botânica é descrita em: Divisão: *Angiospermae* → Classe: Dicotiledônea → Ordem: *Myrtiflorae* → Família: *Lecythidaceae* → Gênero: *Bertholletia* → Espécie: *excelsa*. A família tem 325 tipos de árvores nos trópicos americanos, divide-se em 15 gêneros, em que o *Bertholletia* é dominante com 75 espécies. (BRASIL, 2002).

A castanheira é uma árvore de grande porte (Figura 1), com até 50 m de altura e 2 m de diâmetro na base e caule cilíndrico, liso, desprovido de ramos até a fronde, Possui casca escura e fendida, ramos encurvados nas extremidades, folhas esparsas, alternadas, pecioladas (pecíolo cilíndrico-caniculado), oblongas ou ovalado-oblongas, curto acuminadas, onduladas, verde-escuras na parte superior e pálida na inferior (BRASIL, 1976). A dispersão de suas sementes, crescimento e capacidade de produção de frutos parecem ser afetados por vários fatores, como por exemplo, ação de cipós e animais (PERES et al., 2003; KAINER et al., 2006).

O fruto da castanheira é chamado de “ouriço”, constituindo-se uma camada de substância lenhosa (Figura 1). É uma cápsula (pixídio) globosa deprimida, quase esférica, de 08 a 16 cm de diâmetro, tendo visível na parte superior o resto do cálice. A casca do fruto é espessa, lenhosa, dura, de cor castanha, repleta de células

resinosas. Podem pesar de 0,5 a 5 kg e conter de 10 a 25 sementes, angulosas, agudas, mais ou menos triangulares, transversalmente rugosas, estreitamente comprimidas, envoltas em polpa amarela, dispostas em três séries (BRASIL, 2002).

A amêndoa da castanheira é composta, principalmente, por tecidos parenquimáticos delimitados por um anel de tecido meristemático, sendo estes envoltos por uma camada epidérmica e uma película lignificada. O epicótilo e a raiz primária são formados dos tecidos meristemáticos preexistentes localizados, preferencialmente, nas regiões dos pólos, caulinar e radicular. A estrutura anatômica do embrião explica, em parte, o lento processo germinativo nesta espécie e relaciona-se com o sucesso em sua dispersão em condições naturais (CAMARGO; CASTRO; GAVILANES, 2000). A semente, comumente chamada de *amêndoa*, é encontrada em diversos tamanhos, e comercializada/beneficiada de acordo com a classificação do Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 1998) em: *com casca* e *sem casca* (Figura 1). Comercialmente, considera-se que cada hectolitro de castanha pesa de 47 a 60 kg (TUPIASSU; OLIVEIRA, 1967). Microscopicamente, a castanha-do-Brasil revela estruturas firmemente organizadas caracterizando um aspecto de rugosidade ao agrupar seus componentes estruturais. As diversas formas da castanha-do-Brasil estão dispostas na Figura 1.



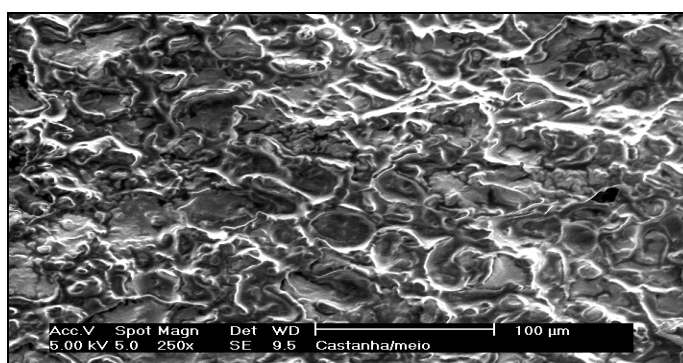
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1. A Castanha-do-Brasil: (a) árvore da castanha-do-Brasil (*Betholletia excelsa*); (b) Fruto (*Ouriço*) e sementes; (c) Castanha-do-Brasil *com* e *sem* casca; (d) Microscopia eletrônica de varredura da amêndoa da castanha-do-Brasil, eixo transversal (250 x - 5.000 kv).

Pacheco; Scussel (2006)

2.1.1 Distribuição geográfica

A castanheira é uma árvore social e vegeta em maciços de altura dominante das demais árvores da floresta, existindo esparsa e em pequenos grupos (BRASIL, 1976). É uma planta encontrada em sua maioria, em estado nativo na Amazônia, com algumas tentativas de plantio, e localiza-se em maiores concentrações na porção brasileira, como apresentado na Figura 2 (PACHECO; SCUSSEL, 2007).

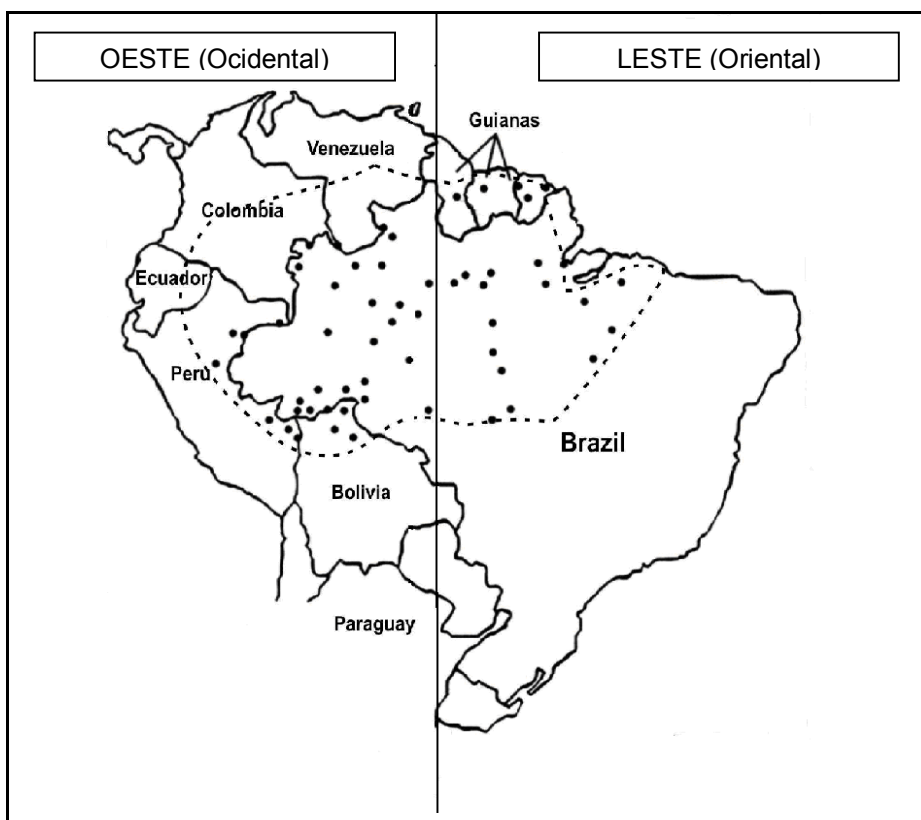


Figura 2. Distribuição da castanheira-do-Brasil entre as regiões (Oeste e Leste) da Bacia Amazônica
Pacheco; Scussel (2007)

Ocorre principalmente no planalto que separa a bacia formada pelos afluentes do baixo Amazonas, alto Tocantins e alto Moju, e em terras altas ao norte do Rio Jarí, no Pará, e no Acre, até o alto Beni, na Bolívia (MULLER, 1981). No Brasil, vicejam nas regiões dos rios Madeira, Purus, Negro e Solimões (Estado do Amazonas), e também nos Estados do Maranhão, Mato Grosso, Roraima, Rondônia e Amapá (Figura 3). No Estado do Amazonas, a castanheira é distribuída uniformemente em todo território, porém sua ocorrência é mais freqüente ao longo das calhas dos rios Madeira, Purus e Solimões. Algumas das áreas do estado possuem usinas de beneficiamento, áreas com implantação de programas de boas práticas em andamento, bem como área extrativista com certificação orgânica (Figura 4).

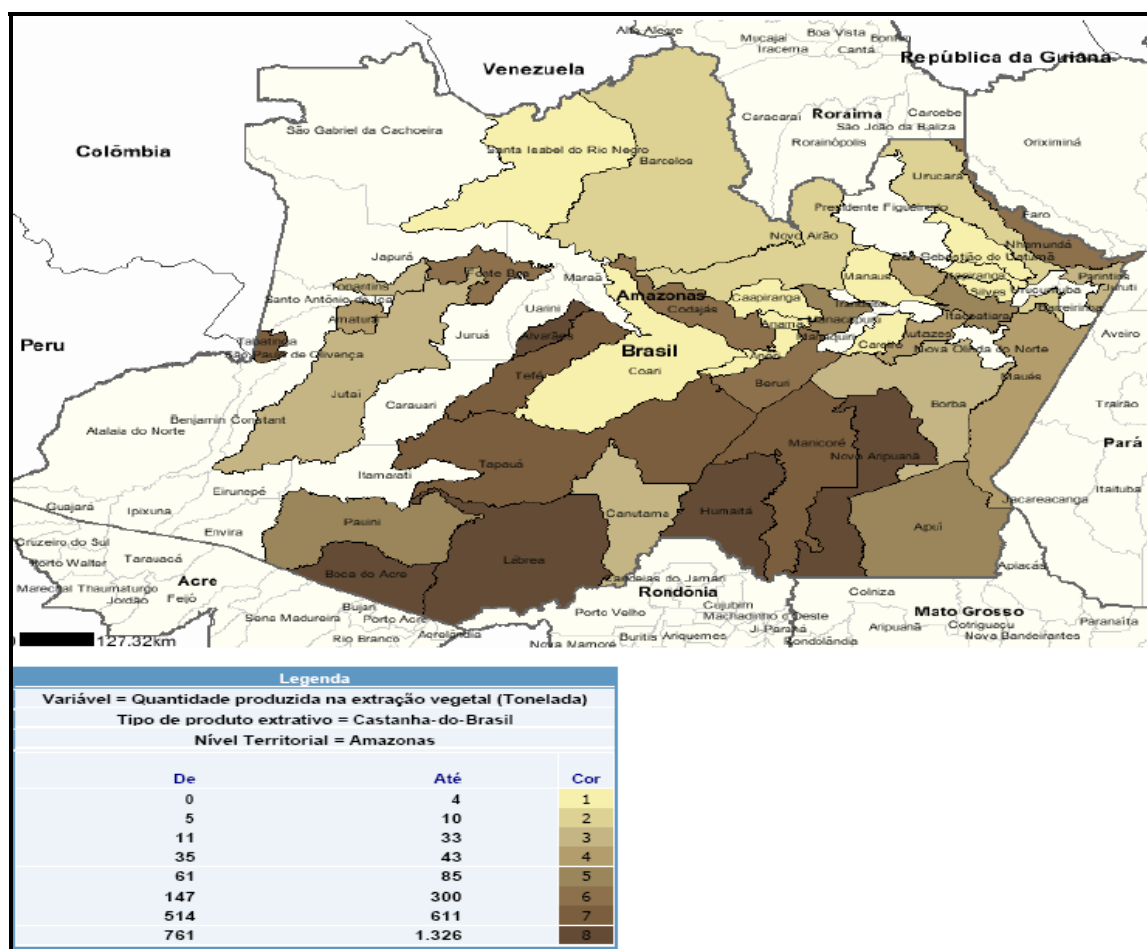


Figura 3. Quantidade produzida/extraída de castanha-do-Brasil em municípios do Estado do Amazonas IBGE (2005)

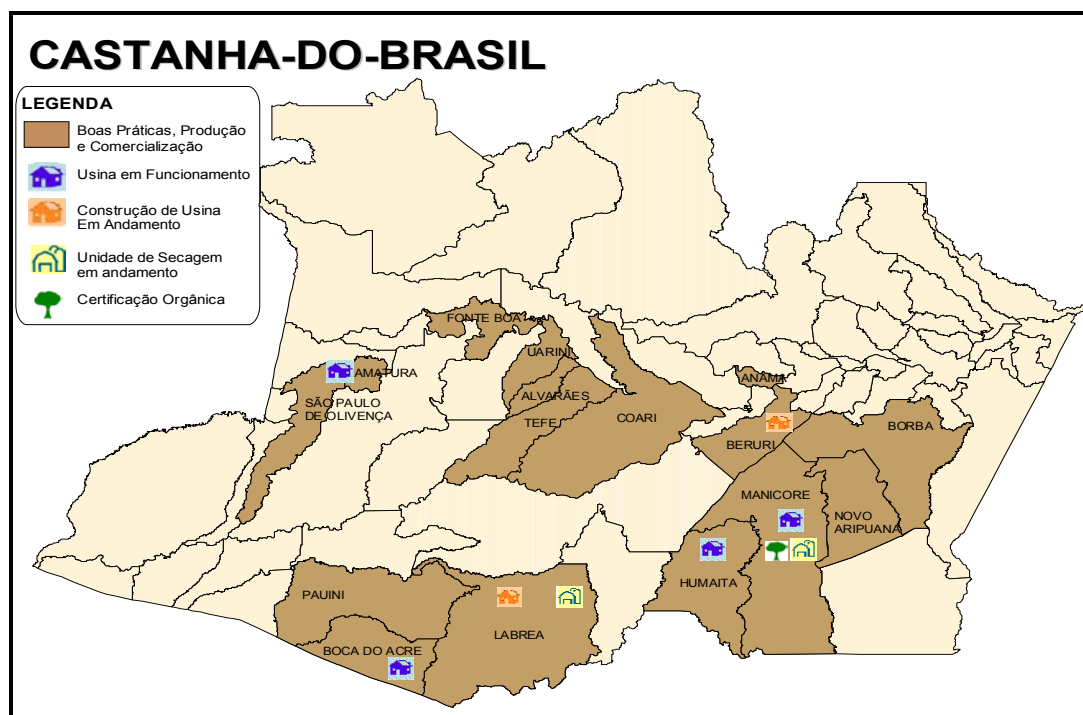


Figura 4. Municípios do Estado do Amazonas e atividades relativas à castanha-do-Brasil Amazonas (2005)

2.1.2 Composição nutricional

A amêndoa constitui um alimento bastante apreciado não só pelo seu sabor, como também pelas suas qualidades nutritivas. Sua composição tem sido amplamente estudada, e demonstra ser uma rica fonte nutricional, e é popularmente chamada de “Carne Vegetal”, por ser um alimento energético, rico em proteínas e valorizado pela presença de antioxidantes (GLÓRIA; REGITANO DARCE, 2000; COZZOLINO, 2001).

De acordo com a composição nutricional da castanha-do-Brasil, os componentes mais abundantes são os lipídios, seguidos pelas proteínas, carboidratos e fibras, de forma que o valor energético é bastante elevado (MOODLEY et al., 2007). É importante ressaltar que os níveis dos nutrientes diferem com o tamanho da castanha, sua variedade e origem e algumas destes resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição nutricional básica da amêndoa de castanha-do-Brasil

Resultados em 100g de amostra integral					Autores
Valor Calórico (Kcal)	Lipídios (g)	Proteínas (g)	Carboidratos (g)	Fibra total (g)	
666,00	65,9	14,40	11,0	2,10	Almeida (1963)
-	66,8	13,6	10,3	-	Andrade et al. (1999)
676,56	67,3	14,29	3,42	8,02	Souza; Menezes (2004)
-	66,7	19,93	0,69	-	Venkatashalam; Sathe (2006) ^a
-	66,8	13,6	10,3	-	Moodley et al.(2007)

^a resultado em matéria-seca desengordurada

Os lipídios são compostos importantes para conferir propriedades organolépticas aos alimentos, como odor e cor. São misturas de glicerídeos (mono, di e tri-glicerídeos) e oxidáveis em diferentes graus (SILVA; MARSAIOLI, 1999). Estes por sua vez, são formados pela associação química entre o glicerol e molécula (s) de ácidos graxos (HOLCAPEK et al., 2003) que, por sua vez, são classificados em saturados e insaturados (mono e polinsaturados), dependendo do número de duplas ligações em sua estrutura química.

Os ácidos graxos insaturados são considerados como uma das maiores causas de danos nas propriedades sensoriais de alguns alimentos devido às reações oxidativas que levam à formação de hidroperóxidos. Estes, apesar de transitórios são mais estáveis que os radicais, e resultam na produção de *Dienos Conjugados*

(DC) devido ao rearranjo das duplas ligações que passam da posição malônica para a posição conjugada. Hidroperóxidos de ácido linoléico e linolênico, por exemplo, contém grupamento dieno fortemente absorvido em 234 nm. Mudanças no espectro ultravioleta (UV) são utilizadas para medir níveis de oxidação, pois podem indicar que o aumento da absorbância, devido à formação de DC, pode ser proporcional a incorporação de O_2 e formação de peróxidos durante as primeiras fases de oxidação (VIEIRA; REGITANO-D'ARCE, 1999). Nos estágios de formação dos compostos, quanto maior a absorção em 232 nm, maior a concentração de peróxidos (início da oxidação). De forma contrária, quanto maior a absorção em 268 nm (formação de trienos conjugados - TC), maior a concentração de produtos secundários. O aumento da absorbância, teoricamente, reflete a formação de oxidação primária em óleos e gorduras e é proporcional a incorporação das moléculas de O_2 . Quanto maior os níveis de DC e TC menor é a estabilidade oxidativa dos óleos (CHATTA et al., 2006). O uso de DC e TC como parâmetros para avaliar estabilidade oxidativa de óleos é uma boa alternativa em relação a métodos tradicionais como, por exemplo, a medição de peróxidos, que pode ser limitado por refletir dados sobre a fase inicial de oxidação e não de todo o processo. Ryan et al. (2006) analisaram castanha-do-Brasil, em que o índice de peróxidos foi encontrado em torno de 0.16 mEq O_2 /kg óleo. Na análise de DC e TC em diferentes temperaturas de armazenamento, nas castanhas com casca os resultados em 232 nm foram de 0,555 a 0,765 e em 270 nm, de 0,050 a 0,098. A presença de compostos menores (270 nm) foi maior nos óleos de castanhas descascadas mantidas no ambiente, pois com o aumento da conjugação de dienos em 232 nm, aumenta proporcionalmente a absorção de O_2 e a formação de peróxidos nos estágios iniciais de oxidação. Os resultados de absorção em 270 nm confirmaram estado mais avançado de oxidação em descascadas (RIBEIRO; REGITANO-D'ARCE; LIMA, 1993). Também são considerados importantes na avaliação de óleos, os índices de iodo e de saponificação e alguns resultados de pesquisas estão citados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros para qualidade do óleo de castanha-do-Brasil

Parâmetros	Fontes		
	Pechnik et al. (1950)	Almeida (1963)	Moodley et al. (2007) ^a
Índice de acidez (mg KOH/g óleo)	-	1,2	1,45
Índice de Refração (25°C)	1,458-1,464	1,4658 ^b	1,4725
Índice de Iodo (mg iodo/100 mg de óleo)	97-109	100,2	74,2
Índice de Saponificação (mg KOH/g óleo)	192-202	193	192,4

^a extraído de castanha obtida no varejo ^b a 40°C

A hidrólise das gorduras com a formação de ácidos graxos livres e oxidação de lipídeos também podem ocorrer devido à ação das enzimas lipase e lipoxigenase que são catalisadas por condições específicas dependentes de UR % ou rompimento da integridade celular do substrato. Portanto, a inativação enzimática pode ser um mecanismo necessário na manutenção da qualidade de alimentos e evitar a perda do *flavor* e outras formas de deterioração.

Estudos sugerem que pode haver relação entre a frequência de consumo de nozes com redução da incidência de doenças do coração, constituindo uma fonte alimentar, benéfica à saúde apesar de as nozes serem reconhecidamente ricas em teor lipídico (KOCYIGIT et al., 2006). No caso da castanha-do-Brasil, o teor atinge 60-70%, bem como o teor de ácidos graxos saturados e insaturados, com nível de 73 % (ácido oléico e linoléico) superior a outras nozes (KORNESTEINER et al., 2006; RYAN et al., 2006; VENKATACHALAM; SATHE, 2006).

Por outro lado, devido ao alto teor de ácidos graxos polinsaturados (Tabela 3), o óleo da castanha-do-Brasil pode ser instável, já que a estabilidade dos lipídios é diretamente dependente do manuseio e condições de estocagem do alimento, assim como da área de origem. Tais fatores não podem ser desconsiderados, pois podem afetar a qualidade do óleo e aumentar a acidez, principalmente devido ao ácido oléico e linoléico. De acordo com a posição dos ácidos graxos na estrutura do glicerol os principais tri-glicerídeos do óleo de castanha-do-Brasil são: LLL, OLL, LLP, OLO, LOP, OOO, onde P, O e L são os ácidos palmítico, oléico e linoléico, respectivamente (HOLCAPEK et al., 2003).

Tabela 3. Composição em ácidos graxos (%) do óleo extraído da castanha-do-Brasil

Ácidos Graxos ^a	Andrade et al. (1999)	Ryan et al. (2006)	Venkatachalam; Sathe (2006)
Mirístico (14:0)	ND ^b	0,06	0,05
Palmítico (16:0)	ND	13,50	0,00
Palmitoléico(16:1)	ND	0,33	15,1
Margárico(17:0)	15,0	0,22	0,08
Esteárico (18:0)	10	11,77	9,51
Oléico (18:1)	28,0	29,09	28,75
Linoléico (18:2)	6,9	42,80	45,43
Linolênico (18:3)	21,7	0,20	0,18
Araquídico (20:0)	24,9	0,54	0,25
Gadoléico (20:1)	ND	0,21	0,00
Behênico (22:0)	-	0,12	0,06
Erúcico (22:1)	-	0,34	0,00

^a Número de átomos de carbono:número de insaturações ^b Não detectado

Nos trabalhos pioneiros sobre castanha-do-Brasil, a fração protéica da globulina foi identificada e chamada de *Excelssina*, assim como foi observada e riqueza em todos os aminoácidos essenciais, com elevado teor de sulfurados (metionina e cisteína), geralmente insuficientes em proteínas vegetais (SOUZA, 1963).

A amêndoa apresenta proteína completa, em que os valores dos escores químicos dos aminoácidos essenciais são superiores aos do padrão teórico da *Food and Agriculture Organization* (FAO). A fração protéica 2S da castanha-do-Brasil é rica nestes aminoácidos sulfurados, e tem sido utilizada em processos de modificação de alimentos, para enriquecimento de características nutricionais, como por exemplo, do feijão (NORDLEE et al., 1996). Na Tabela 4 são apresentados os aminoácidos totais identificados na amêndoa da castanha-do-Brasil, ressaltando que o alto teor de aminoácidos sulfurados presentes são superiores aos dados da FAO para metionina e cisteína (FAO, 1970).

As amêndoas contêm de 15 a 17% de proteína em matéria fresca e cerca de 50% de proteína em matéria seca desengordurada, sendo o total de proteína da amêndoa de 8,3% de metionina e cisteína/peso. A proteína total pode ser fracionada em três Frações 11S, 7S e 2S, e a Fração 2S é a mais significativa (SUN, 1987). Dessa fração foi purificada a proteína sulfurada, com 18% de metionina e 8% de cisteína. Nas estruturas isoformes da fração 2S albumina em castanha-do-Brasil, observou-se que o maior polipeptídeo extraído, com peso molecular calculado usando padrões da

proteína conhecida, de aproximadamente 12000, coincidiu com o peso conhecido da Fração 2S da castanha-do-Brasil (MORENO et al., 2004).

Tabela 4. Aminoácidos totais da amêndoa da castanha-do-Brasil.

AA/PTN (g/100g)	Aminoácidos totais na amêndoa			
	Souza; Menezes (2004)	Venkatachalam; Sathe (2006)	Dados FAO	
			Padrão	Teórico
Ac. Aspártico	10,11	7,69	-	-
Threonina	3,02	2,27	3,40	40
Serina	5,24	4,00	-	-
Ácido Glutâmico	25,1	20,26	-	-
Prolina	4,76	5,21	-	-
Glicina	5,72	4,30	-	-
Alanina	4,32	4,30	-	-
Valina	5,12	4,71	3,50	50
Metionina	7,12	8,98	2,50 ^a	35 ^a
Cisteína	2,33	0,75	-	-
Isoleucina	3,09	3,21	2,80	40
Leucina	8,58	7,89	6,60	70
Tirosina	3,23	2,47	-	-
Fenilalanina	4,90	4,06	-	60 ^b
Lisina	4,53	2,95	5,80	55
Histidina	3,11	2,92	1,90	-
Triptofano	1,10	0,71	1,10	10
Arginina	17,30	12,91	-	-

^a Metionina+cisteína; ^b tirosina+fenilalanina.

O teor de açúcares nos alimentos pode ser determinante na presença de fungos deterioradores por favorecer o metabolismo dos microrganismos e, conseqüentemente, por danos causados nos produtos, portanto alguns estudos têm sido feitos no que diz respeito às diversas formas de carboidratos em alimentos, como por exemplo, celulose e lignina.

A composição de carboidratos apresenta variação de 0.69 g% (VENKATACHALAM; SATHE, 2006) a 10.3 g % em matéria seca (ANDRADE et al., 1999). Já o teor de fibra foi determinado por Souza e Menezes (2004) em 8,02 g %, em que 3,12 g % de fibra solúvel, e 4.89 g % de fibra insolúvel. Em castanha-do-Brasil (amêndoa + casca) analisadas por hidrólise com ácido sulfúrico, quantitativamente, por cromatografia de troca iônica, foi detectado teor de 60 % de lignocelulose e 33 % de açúcares em matéria seca, assim como xilose (34 %), glicose (55 %), arabinose (2 %), galactose (3 %), rhamnose (1 %) e manose (1%) (SINER; PULS; DIETRICH, 1979).

Para diminuir a poluição ambiental decorrente de resíduos de processamento, foi realizado teste de pirólise de lignocelulose em diferentes temperaturas da casca de castanha-do-Brasil, como fonte de carbono. Na composição do material foram detectados 48,5 % de holocelulose e 59,4 % de lignina, assim como 22,2 % de carbono fixo, sugerindo que o processo causa mudanças significativas na textura e morfologia do material (BONELLI et al., 2001).

Há ampla diferença entre o teor de alguns minerais em castanha-do-Brasil (Tabela 5), entretanto, não foram detectados valores relevantes de metais pesados, como Arsênio (As), Chumbo (Pb) e Mercúrio (Hg) (FURR et al., 1979). A presença de valores elevados de Ferro (Fe), Magnésio (Mg) e Manganês (Mn) também podem ser interessantes do ponto de vista nutricional, no enriquecimento de dietas (CHUNHIENG et al., 2004).

Em estudo que avaliou a quantidade de As, em castanha-do-Brasil com e sem casca, os valores foram de 3,0 e 2,8 ng.g⁻¹, respectivamente. Em testes para determinação do teor de oxalato gástrico e intestinal de solubilidade, a castanha-do-Brasil apresentou valores elevados de 492,0 e 304,5 mg % de matéria seca, respectivamente, considerados relativamente altos, quando comparados com outras nozes, como o amendoim (205,3 mg %) ou pistache (67,4 mg %) (RITTER; SAVAGE, 2007).

Tabela 5. Teor de minerais da castanha-do-Brasil

Componente ^a	Furr et al. (1979) ^b	Andrade et al. (1999)	Gonçalves et al. (2002) ^c	Chunhieng et al. (2004)	Moodley et al. (2007) ^b
Arsênio	0,02	-	-	-	0,013
Cálcio	1592	132	206,75	6060	7432,8
Chumbo	0,4	-	-	-	-
Cromo	0,6	-	-	-	1,34
Cobre	1,9	1,30	1,17	-	59,44
Ferro	93	3,4	9,67	80	74,26
Fósforo	1,7	674	564,50	23800	-
Magnésio	3370	160	312,50	13380	9678,5
Manganês	8	0,6	6,85	50	3,4
Mercúrio	0,01	-	-	-	-
Potássio	5405	644	514,75	19690	-
Sódio	7,2	2,0	-	20	-
Zinco	41	3,5	7,1	115	110,31

^a mg%

^b embalagens do varejo

^c origem: árvores próximas de Manaus (AM) Brasil

A castanha-do-Brasil possui constituintes reconhecidamente associados à ação antioxidante contra os radicais livres decorrentes dos processos metabólicos nos organismos (FRAGA, 2005; REILLY, 2006) e quanto ao teor vitamínico, destaca-se o elevado teor de vitamina E, que pode estar relacionado com o teor de α -tocoferol (CHUNHIENG, 2004). A Tabela 6 apresenta um resumo dos teores de vitaminas.

Tabela 6. Teores de vitaminas presentes na castanha-do-Brasil.

Vitamina ^a	USDA (2003)	Duke (1989)
A (UI)	0	-
B1	-	0,2
B2	-	0,69
B3	-	0,2
B6	0,029	-
B12	0	-
C	0	2,0
D	-	-
K	0	-
E	1,62	-
Niacina	0,084	0,2

^a mg%

Estudos epidemiológicos indicam que substâncias antioxidantes são úteis na prevenção de doenças causados pela ação de radicais livres nos processos metabólicos do organismo (SEIFRIED et al., 2007). Os tocoferóis associados aos compostos fenólicos podem agir como compostos funcionais, com efeito preventivo contra câncer e doenças coronarianas em populações que consomem nozes com frequência (KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA, 2006). Na castanha-do-Brasil, β e γ tocoferol foram os mais predominantes em relação à quantidade de tocoferóis (<7mg/100g óleo) e seus valores são apresentados na Tabela 7.

Os compostos fenólicos, também considerados funcionais, devido às suas propriedades benéficas à saúde, foram encontrados em castanha-do-Brasil, com teor de 112 mg % de ácido gálico, mais elevado que em amêndoas (47 mg %) e macadâmias (46 %) (KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA, 2006). Os fitosteróis, compostos naturais dos alimentos, com estrutura semelhante ao colesterol e propriedades de aumentar a função imune, dentre outras, também foram detectados em castanha-do-Brasil, com 95 % (92-101) de fitosteróis totais, sendo este, um valor alto em relação a outros alimentos, mas reduzido em comparação com amêndoas, com 199 g % (PHILIPS; RUGGIO; ASHRAF-KHORASSANI, 2005).

Tabela 7. Antioxidantes e compostos funcionais em castanha-do-Brasil

Antioxidantes ^a	Philips et al.(2005)	Kornsteiner et al. (2006)	Ryan et al. (2006)	Normen et al. (2007)
α -tocoferol	- ^b	1	82,9	-
γ - tocoferol	-	13,2 ^c	116,2	-
α -TE ^d	-	4,3	-	-
Mg de EAG ^e	-	112	-	-
β Caroteno	-	ND ^f	-	-
Luteína	-	ND	-	-
β Sitosterol	65,5	-	1325,4	94
Campesterol	2,0	-	26,9	3
Stigmasterol	6,2	-	577,5	8
Esqualeno	-	-	1377,8	-
Δ^5 -avenasterol	13,6	-	-	20,5
Sitostanol	4,1	-	-	5,4
Campestanol	2,0	-	-	0

^a %; ^b Não Informado; ^c β - tocoferol e γ - tocoferol; ^d α -tocoferol em equivalentes de vitamina E; ^e EAG= equivalente em ácido gálico/100 g de matéria fresca; ^f Não detectado

Além do elevado teor protéico, lipídico e da presença de antioxidantes, a castanha-do-Brasil possui também componentes que podem conferir outras propriedades, como a alergenicidade decorrente da presença da fração protéica e também componentes químicos com radioatividade.

Estudos têm buscado caracterizar tanto o quadro clínico quanto aspectos analíticos para identificação do composto responsável pela característica de *alergenicidade* atribuída ao consumo de nozes e alimentos geneticamente modificados, especialmente com a proteína da castanha-do-Brasil. A fração protéica 2S albumina está associada ao excepcional caráter nutricional da castanha, entretanto pode ser responsável pelo quadro clínico característico de diarreia, vômito e perda de consciência em alguns indivíduos (BARTOLOME et al., 1997).

Para enriquecer nutricionalmente alguns alimentos, a proteína da castanha-do-Brasil foi introduzida em alimentos geneticamente modificados, como o feijão (ARAGÃO et al., 1999), a batata, o tabaco (MARCELLINO et al., 1996) e a soja (NORDLEE,1996). Entretanto, em testes com extratos da soja modificada houve reação alérgica positiva na pele dos indivíduos testados e a fração alergênica apresentou estabilidade mesmo sendo tratada térmica e quimicamente (MURTAGH et al., 2003). Por isso, testes têm sido feitos para detectar a presença de castanha-do-Brasil em alimentos, que pela rotulagem, não deveriam contê-la na formulação, colocando em risco consumidores alérgicos à fração protéica (BRETT et al., 2004).

Uma outra característica relacionada à composição da castanha-do-Brasil é o teor de *radioatividade*. Em 1930 foi relatado que a castanha-do-Brasil continha larga concentração de Bário (Ba) de aproximadamente 0,1-0,3 % e, em 1950, foi discutido que também possuía altos níveis de Rádio (Ra) e gerou a discussão quanto à importância de maior investigação sobre o caráter radioativo (TURNER et al., 1958). Apesar de esses elementos possuírem comportamento químico similar, a diferença é que o Ra ocorre na castanha-do-Brasil sob a forma de um mix variável de Ra^{226} e Ra^{228} . Acredita-se que o acúmulo de Ra e Ba provém do extensivo sistema radicular das árvores, mas as concentrações detectadas nas folhas e casca (caule) são maiores do que na castanha (amêndoa). De qualquer forma, a concentração de Ra em castanha-do-Brasil pode chegar até 1000 vezes mais do que em qualquer outro alimento, apesar de que a maioria da quantidade de Ra ingerido não é retida no organismo (GABAY; SAX, 1969).

Para estudar, a excreção de compostos após consumo de castanha-do-Brasil, amostras obtidas de trabalhadores demonstraram a presença de Thorium (Th^{228}), que é um elemento químico acompanhado de atividade semelhante ao Ra^{228} (BULL, SMITH; PHIPPS, 2006). A Tabela 8 contém os resultados de algumas pesquisas quanto à radioatividade da castanha-do-Brasil.

Tabela 8. Compostos radioativos em castanha-do-Brasil

Fontes	Concentração
Turner et al. (1958)	1.8 pCi/g Ra^{226}
Penna-Franca (1959)	2 pCi/g Ra^{228}
Penna-Franca et al. (1968)	0.075-3.6 pCi/g Ra^{226} (3.1-113.5 pCi/g em cinzas) ^a 0.16- 3.6 pCi/g Ra^{228} (5.3-114.5 pCi/g em cinzas) ^a
Smith (1971)	Acima de 6.6 pCi/g Ra^{226} ^a
Hiromoto et al. (1996)	6.7-63.6 Ra^{226} (Bq/kg) ^b 10.1-63.4 Ra^{228} (Bq/kg) ^b
Andrade et al. (1999)	11.9 Th^{228} (Bq/kg)
Kouzes et al. (2004)	37-260 Ra^{226} (Bq/kg)

^a na amêndoa; ^b max-min.

2.1.3 Cadeia produtiva da castanha-do-Brasil

A demanda global da castanha-do-Brasil é muito variável em função da forte competição comercial com outras nozes e outros países exportadores além do Brasil (SIMÕES, 2004). Grande parte da produção é exportada e este fato é atribuído à estabilidade do mercado externo, ao qual, principalmente se direciona a produção.

Tem-se observado, entretanto que as exportações brasileiras diminuíram gradativamente, de 51.195 ton (1990) e 19.301 ton (1995/1996) (EC, 2003). Uma das causas, além da diminuição da oferta do produto e destruição dos castanhais nativos (PERES et al., 2003) foi o surgimento de barreiras não-tarifárias, pela imposição de padrões fitossanitários mais rígidos por parte dos países importadores, como os da União Européia (EU, 2003). Desta forma, as empresas de beneficiamento, procuraram aprimorar os padrões de qualidade e passaram inclusive, a buscar novos mercados, já que a tecnologia de processamento da castanha é variada e utiliza, em sua maioria, grande contingente de mão-de-obra (BRASIL, 2002).

Nas localidades extrativistas os métodos de manejo, transporte e quebra são artesanais, e as condições higiênicas, muitas vezes, precárias e caracterizam-se por iniciar entre os meses de Janeiro a Maio, período da coleta dos “ouriços”, quando caem ao solo na estação chuvosa. Nesta etapa, de cata dos ouriços (frutos), o extrator os coloca em um cesto que leva às costas. Quando o cesto está carregado, são transportados aos barracões (de palha ou cobertos com lonas), denominadas de “região de quebramento” ou “comunidades”, destinadas à operação de extração das sementes. A segunda parte consiste na quebra manual dos ouriços, para a retirada das castanhas. Uma vez extraídas, são lavadas para eliminar impurezas, classificadas e armazenadas a granel, para transporte até o beneficiamento. O produtor colhe entre 2.000 e 3.000 ouriços na sua área e nesta etapa de duas a três pessoas recolhem, cortam, lavam, secam e ensacam a castanha em um período de aproximadamente 20 dias. Posteriormente, a produção é vendida no mercado, geralmente local (BRASIL, 2002).

O produto é armazenado em barracões e levado aos portos primários de comercialização e daí, até a sede do município, sendo o transporte feito por embarcações de pequeno porte, em face da difícil navegabilidade dos rios. Nesta etapa, as maiores dificuldades de transposição surgem em trechos de cachoeiras dos rios, sendo possível somente na estação chuvosa, quando o nível das águas o permite, apesar de que em algumas localidades, o transporte ocorre via terrestre, como no Estado do Acre (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Dos portos de convergências secundários, a castanha é transportada em embarcações (ex. “alvarengas”, balsas e barcos de passeio) até a usina, e após o desembarque, e ficará disposta em montanhas”, ou irá direto para o beneficiamento, onde passará por diversos processos. O esquema genérico da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil, sugerido por Brasil (2002) está na Tabela 9.

As usinas de beneficiamento, de um modo geral, possuem etapas distintas de produção em que, principalmente, selecionam e promovem a secagem da castanha, de forma que os lotes sejam trabalhados e preparados o mais rápido possível, em temperaturas controladas. Um fluxograma do beneficiamento está apresentado na Figura 5, apesar de que, a seqüência de procedimentos é variável de acordo com a usina (CAMPO/PAS, 2004).

Após o beneficiamento, o produto *com casca* é acondicionado em *big bags*, normalmente de 1000 kg, sacos de juta ou polietileno, e o produto *sem casca* em embalagem aluminizada a vácuo ou sacos revestidos com caixas de papelão. Como a maioria dos mercados compradores consiste de outros países, o transporte é normalmente efetuado em *containeres* em navios (refrigerados ou não), já que o transporte aéreo é mais aplicável em pequenos lotes. A castanha descascada e em pedaços (ferida ou quebrada), por sua vez, possui como destino também o mercado interno, em que as indústrias de alimentos representam os principais compradores, existindo ainda as empresas de varejo (PACHECO, 2003).

Tabela 9. Etapas da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil.

Etapas	Fase
Etapa 1: Desde a caída natural dos ouriços até a venda ao intermediário ou à cooperativa, compondo-se de cinco principais fases:	1) Preparo do castanhal 2) Colheita a) Coleta b) Amontoa 3) Pré-beneficiamento a) Corte b) Lavagem 4) Primeiro Transporte a) Terrestre b) Fluvial 5) Primeiro Armazenamento
Etapa 2: Inicia como o segundo transporte, feito pelo intermediário que compra as castanhas do extrativista. Composta de duas fases:	1) Segundo Transporte a) Fluvial b) Terrestre 2) Segundo Armazenamento
Etapa 3: O beneficiamento com casca inicia com a chegada para beneficiamento, composta das seguintes fases:	1) Recepção 2) Terceiro armazenamento 3) Beneficiamento a) Lavagem / Peneiramento b) Secagem c) Resfriamento d) Primeira seleção (Manual) e) Ensaque das castanhas com casca
Etapa 4: O beneficiamento sem casca é a etapa mais longa, composta pela maior número de fases:	1) Autoclavagem 2) Segundo resfriamento 3) Descascamento 4) Segunda seleção por tamanho (mecânica ou manual) 5) Desidratação 6) Terceiro resfriamento 7) Terceira seleção 8) Embalagem
Etapa 5: Industrialização da Amêndoa: é realizada com castanhas sem casca, sendo considerada a última etapa da cadeia produtiva, tendo em vista que o processo de industrialização para obtenção de subprodutos e derivados (óleo, torta / farelo, farinha, leite, biscoitos, doces, etc). As principais fases são:	1) A recepção 2) A seleção 3) O armazenamento
Etapa 6: Comercialização: Esta etapa é considerada importante do ponto de vista da valorização do produto e acompanhando o mercado a que se destina verificam-se dois segmentos: o mercado externo e o interno.	

Brasil (2002)

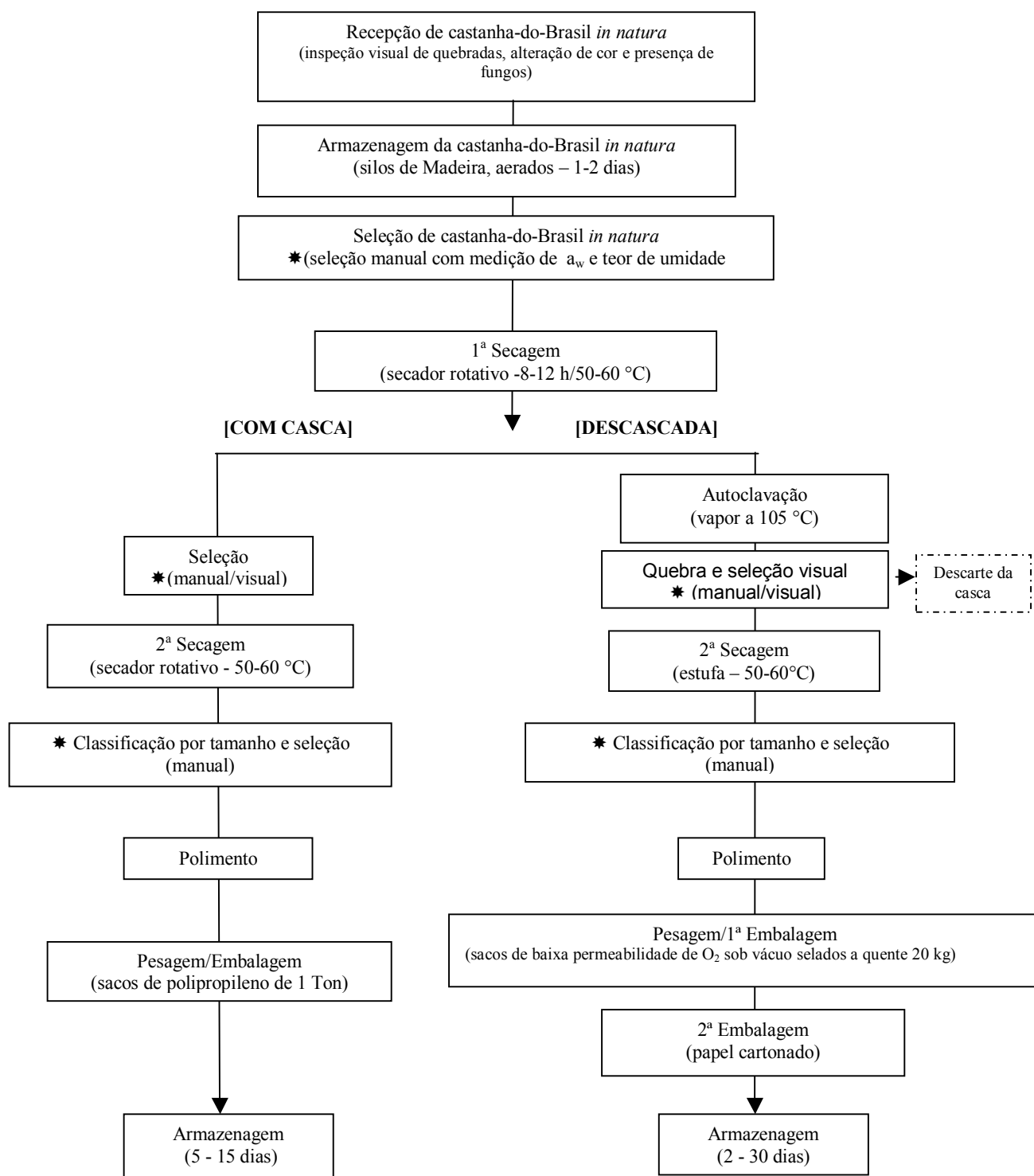


Figura 5 Fluxograma de beneficiamento da castanha-do-Brasil [*] etapas de seleção
Pesquisa de Campo (2007)

2.1.4 Produtos derivados da castanha-do-Brasil

Com a popularização das propriedades nutricionais da castanha-do-Brasil, seu uso, tanto com casca, para extração do óleo, quanto descascada, ou em pedaços, como ingrediente na indústria de alimentos ou matéria-prima para indústria de cosméticos, tem crescido nacional e internacionalmente (SOUZA; MENEZES, 2004).

A castanha *com* e *sem* casca é principalmente exportada, e a amêndoa utilizada como ingrediente na fabricação de produtos industrializados, como biscoitos, óleo, doces, cereais e produtos de panificação (SOUZA, 2003). Especificamente, o óleo tem sido utilizado na fabricação de cosméticos, fitoterápicos, e as cascas, na produção de biocombustível, fabricação de tapetes, peças de artesanato e composição de tintas (BRASIL, 2002). Os Extratos da castanha-do-Brasil são usados como fitoterápicos e também na ação de redução do *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas (CAMPOS et al., 2005).

Souza e Menezes (2004) utilizaram a castanha-do-Brasil como ingrediente em alimentos extrusados de forma a enriquecer o teor protéico de alimentos processados. Alguns produtos incorporaram a castanha-do-Brasil na sua formulação, sendo possível obter cereais matinais castanhas em barras de chocolate, barras energéticas bem como na confeitaria de pães, bolos, biscoitos e massas. A farinha de castanha, assim como a castanha ralada, foi identificada como rica fonte de minerais na alimentação, especialmente infantil e para pessoas de baixa renda, assim como o leite, como ingrediente em formulações (EMBRAPA, 1998).

O óleo da castanha-do-Brasil obtido pela prensagem das sementes, ou com uso de solvente, tem sido utilizado no enriquecimento de alimentos industrializados (SOLIS, 2001) e de forma a promover a sua qualidade novos métodos para purificação, deacidificação e extração têm sido testados além da tradicional prensagem (PENEDO; COELHO, 1997; RODRIGUES et al., 2005; FREITAS et al., 2007). Além da aplicação na fórmula de cosméticos, o óleo também pode ser utilizado em adição a meios específicos, como fonte de carbono para microrganismos, propiciando a produção de substâncias biosurfactantes, que devido à importância ecológica, são mais aceitos que os surfactantes sintéticos (COSTA et al., 2006).

Em derivados da castanha-do-Brasil, a embalagem também parece ser determinante para prevenir a oxidação dos lipídios, apesar de que, outras substâncias antioxidantes também foram testadas para conferir maior estabilidade contra a rancidez, e que parece ser um importante fator para afetar as características sensoriais dos produtos derivados da castanha-do-Brasil (PRADO-FILHO, 1994; GUTIERREZ, REGITANO D'ARCE, VIEIRA; RUAENMIGUEL, 1997; SOUZA; MENEZES, 2004).

Além da utilização da castanha-do-Brasil como aperitivo, ela tem alcançado outros grupos de consumidores, tais como: crianças, esportistas e pessoas da terceira idade. A produção de castanhas cobertas com camadas doces (drageados), de chocolate ou iogurte e também como salgado, apenas com sal e condimentos do tipo ervas e pimenta, tem sido bastante difundida e aceita pelos consumidores brasileiros e também de outros países (EMBRAPA, 1998).

2.1.5 Qualidade da castanha-do-Brasil

Além da deterioração da castanha-do-Brasil decorrente de suas características químicas, tais como a degradação do óleo, outros perigos químicos e microbiológicos podem estar relacionados e afetar a qualidade do produto.

O uso de agrotóxicos (ex. fosfina) no combate às pragas associadas ao armazenamento da castanha-do-Brasil necessita de controle rígido, já que larvas de insetos da família *Curculionidae* foram detectadas em ouriços, e além de estragar a entrecasca da castanha (tornando-a quebradiça e pulverulenta) promovem sulcos rasos no mesocarpo (CASTRILLON; PURCHIO, 1988). O manejo adequado inclusive em embarcações é necessário também para evitar contaminação por substâncias químicas (diesel, por exemplo) durante o transporte. Entretanto, tais situações ocorrem de forma isolada, pois, como produto do extrativismo, a castanha-do-Brasil deve adquirir a classificação de Produto Orgânico (sem adição de produtos nocivos), exigência de alguns mercados relacionados ao *comércio justo*. A presença de cascas, pedras, madeira, pedaços de plásticos e vidro também podem representar perigos físicos ao beneficiamento, e afetar a qualidade do produto acabado, pois se ingeridos pelo consumidor, podem causar dano à saúde, de forma que os processos tecnológicos devem ter caráter preventivo (CAMPO/PAS, 2004).

Apesar da necessidade de normas em nível nacional e internacional para exploração comercial da castanha-do-Brasil ter sido identificada, oficialmente desde a década de 1920 (BRASIL, 1929), as medidas regulamentares ainda não foram completamente adotadas por extrativistas e usinas. Por outro lado, melhorias e iniciativas públicas com programas para a castanha-do-Brasil têm sido discutidas, e propostas nos diversos países que a exportam. Dentre essas ações estão:

No Brasil, o *Projeto de monitoramento e controle de micotoxinas na castanha-do-Brasil* (BRASIL, 2002) e o Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal - PNSQV (BRASIL, 2003), com objetivo de controlar os níveis de contaminantes e resíduos químicos e biológicos, conforme os limites estabelecidos na legislação, evitando perdas e agregar valor aos produtos de origem vegetal. No *Amapá*, por exemplo, em 1980, foi realizado um estudo de oportunidade de investimento quanto ao perfil de industrialização da castanha-do-Brasil e formulado o Projeto Castanha-do-Brasil. No *Amazonas*, em 2002, foi estabelecido o Projeto de “Controle da contaminação por aflatoxinas na Cadeia Produtiva da castanha-do-Brasil PNOPG/CNPq”, bem como, a partir de 2003, a Agência de Florestas e Negócios Sustentáveis do Amazonas (AFLORAM) iniciou a execução do Projeto de Boas Práticas na Coleta e Armazenamento da Castanha (AMAZONAS, 2005).

No Acre, a EMBRAPA em 2001 definiu o projeto “Demandas tecnológicas para o processamento de castanha (*Bertholletia excelsa* Humb. e Bompl.) no Estado do Acre”, bem como parceria com o Programa Alimentos Seguros (CAMPO/PAS) na elaboração de um material didático para a segurança na cultura da castanha-do-Brasil. No *Pará*, foi aplicado o Projeto de Manejo dos territórios quilombolas com a exploração da castanha-do-Pará em Oriximiná (PA). Em *Rondônia*, os trabalhos pela cultura da castanha se referem principalmente à pesquisas com o melhoramento genético, germinação para a obtenção de variedades mais precoces e técnicas mais aprimoradas de manejo e cultivo (EMBRAPA, 2002).

Na Bolívia, foi definida em 1999 a *Propuesta Del PAPN-UMSS a las Autoridades Estatales Y a los Productores de la Castanha de Bolívia* de forma a inserir o *Programa de Alimentos Y Productos Naturales* (PAPN) no melhoramento da castanha e seus subprodutos na Bolívia. Em 2005, foi definido por meio de

instituições internacionais, o Projeto *Safe Nut* em parceria com os Estados do Acre, Pará e com o Ministério da Agricultura com objetivo de executar ações pontuais para segurança da cadeia produtiva.

2.2 Selênio

Outro composto da castanha-do-Brasil, o Selênio (Se), constitui um elemento apreciado pela ação antioxidante, presente em grandes quantidades em alguns alimentos (ex. nozes de árvores). Entretanto, é um elemento bastante estudado devido à ambigüidade de sua ação, benéfica ou tóxica em organismos.

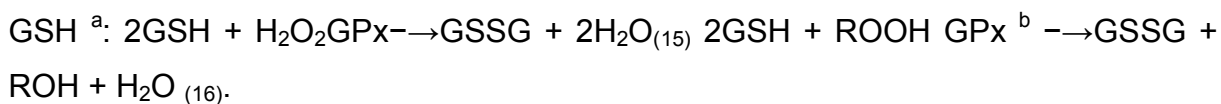
2.2.1 Características do selênio

Na natureza, o Se pode estar isolado na forma de Selenito (SeO_3^{-2}) em ambientes de pH neutro, levemente oxidado, e são menos solúveis que os selenatos (UDEN et al., 2004). Os Selenatos (SeO_4^{-2}) podem ser facilmente lixiviados do solo e transportados para superfícies aquáticas, tornando-se disponíveis para absorção das plantas. Algumas destas têm habilidade de acumular maior quantidade de Se, em solos ricos neste elemento, que é o que parece acontecer em algumas regiões da Amazônia. A concentração de Se depende da eficiência com que esse elemento é absorvido pelas raízes das árvores no solo, inclusive da maturidade/variedade da planta, da forma química do Se e pH, e que pode gerar heterogeneidade do teor de Se por amêndoa, mesmo em lotes de mesma procedência (REILLY, 2006). Além do acúmulo em plantas, o Se pode estar em quantidades elevadas também em superfícies aquáticas, tecidos vivos e sangue, pois, a enzima GPx Se-dependente compete com a catalase por H_2O_2 como substrato e pode ser uma ótima fonte de proteção contra baixos níveis de stress oxidativo (VALKO et al., 2006). Em alimentos, como por exemplo, na castanha-do-Brasil, o Se está associado à fração protéica na forma de Se-Metionina e/ou Se-Cistina (MORENO et al., 2004)

a) Atividade antioxidante

As propriedades antioxidantes do Se, podem ser esclarecidas por este ser um elemento fundamental à constituição da enzima Gluthationa peroxidase (GPx), responsável pela ação seqüestrante dos radicais livres no organismo, e um dos mais importantes mecanismos de defesa antioxidante.

Há duas formas básicas da enzima: GPx Se-independente (glutathione-S-transferase, GST, EC 2.5.1.18) e GPx Se-dependente (GPx, EC 1.11.1.19). Essas duas enzimas diferem no número de subunidades de Se no centro ativo da enzima e seus mecanismos de catálise. Em humanos, há quatro tipos de GPx Se-dependente e todas reconhecidamente adicionam dois elétrons para reduzir os peróxidos pela formação do composto Se-OH (COUTINHO, 2003). As propriedades antioxidantes das Se-enzimas podem eliminar os peróxidos como substratos, e a principal reação ocorre com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou formas orgânicas de peróxidos (ROOH), que são decompostos até álcool enquanto que, simultaneamente, oxidam, pela reação:



^a Glutathione ; ^b glutathione peroxidase

Para avaliar a ação antioxidante, o selenito de sódio (Na₂SeO₃) foi testado no desenvolvimento de insetos e observou-se efetiva inibição das anormalidades induzidas por AFB₁, bem como habilidade antagonista de Na₂SeO₃ aos danos ao DNA causados pela AFB₁ (GEYIKOGLU; TURKEZ, 2005). Os resultados de estudos que investigaram os efeitos de AFB₁ e AFB₁+SE em vários estágios de desenvolvimento de *Drosophyla melanogaster* sugeriram que o Se pode efetivamente inibir a indução de anomalias por AFB₁ (UYSAL; AGAR, 2005). Em células de hamster enriquecidas com Na₂SeO₃, e inibiu a formação de aductos de DNA + AFB₁, protegendo-as contra mutagenicidade. Também ratos alimentados com dietas deficientes em Se foram mais resistentes a AFB₁.

c) Toxicidade

Entretanto, não só a ação antioxidante tem sido relatada por parte do Se, mas também a ação pró-oxidante, ou tóxica, associada aos elevados teores de Se em alimentos, inclusive causa de doenças (REID et al., 2004; FRAGA, 2005). Diferentes concentrações de Na₂SeO₃ (0.052-4 %) foram testadas para avaliar o crescimento de *A. parasiticus*, cujo número de células decresceu com o aumento da concentração.

A concentração de biomassa fúngica teve um leve decréscimo em baixas concentrações e foi fortemente inibida em altas concentrações de Na_2SeO_3 , bem como houve leve estímulo da formação de AFL em baixas concentrações e uma forte inibição em altas concentrações (ZOHRI; SABER, MOSTAFA, 1997).

Em *Sacharomyces cerevisiae*, o Na_2SeO_3 e seleno-DL-methionina, demonstraram exercer efeitos tóxicos em alta concentração e, em baixa, antimutagênicos e anticarcinogênicos (BRONZETTI et al., 2001). A relevância da formação de radicais livres e stress oxidativo quanto à produção de AFL, comparando o teor de necessidade de O_2 foi testado quanto ao status antioxidante de uma cepa toxigênica de *A. parasiticus*, contra uma cepa não toxigênica. Os resultados sugeriram que a produção de AFL parece ser uma consequência do aumento do stress oxidativo devido à peroxidação lipídica e formação de radicais livres (JAYASHREE; SUBRAMANYAM, 2000). Em estudos sobre a resposta do plasma de humanos à toxicidade de Se, não foi observada séria toxicidade e em testes de stress oxidativo (induzido por dieta com diferentes concentrações de Se para atividade reprodutiva de ratos), foi observada que em um dos grupos houve significativa diminuição do número de espermatozóides.

Os Se-compostos parecem ser tanto citotóxicos, quanto carcinogênicos, dependentes da concentração, e que a toxicidade pode estar associada ao stress oxidativo (LETAVAYOVÁ; VICKOVÁ; BROZMANOVÁ, 2006). Devido ao caráter controverso desses compostos, outras pesquisas são necessárias quanto às doses terapêuticas e as doses tóxicas (REID et al., 2004; KAUR; BANSAL, 2005). Na investigação de antagonistas aos Se compostos, arsênio e mercúrio, por exemplo, foram testados em dietas com grãos com alto conteúdo de Se, e os elementos demonstraram resultados promissores.

2.2.2 Fontes de Selênio em alimentos

O teor de Se nos alimentos é variável, e as nozes de árvores são reconhecidamente ricas neste elemento. De forma específica, a castanha-do-Brasil, tem sido destaque, devido ao teor de Se em relação a outros alimentos, de forma a ser extensamente avaliada, com tentativas de aplicação nutricional em grupos específicos de consumidores.

Além das nozes de árvores, a presença de elevado teor de Se também é observada na parte comestível de frutos do mar como, por exemplo, espécies de lagosta e caranguejo, com 54 e 84 mg/kg de Se, respectivamente (BARCLAY, et al., 2005). Dentre os produtos vegetais destacam-se alguns tipos de chás e o café torrado e moído com $8,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$, além da macadâmia ($6,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e do côco ($6,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

2.2.3 O selênio e a castanha-do-Brasil

Em um dos primeiros trabalhos a pesquisar o teor de Se em castanha-do-Brasil, amostras compradas em Nova York (pacotes no varejo) foram avaliadas, e o teor de Se foi de: castanha sem casca com 4,44 (0,20-35,9 mg/kg) e, com casca com 37,3 (0,20-253,0 mg/kg) (SECOR; LISK, 1989).

Com o intuito de associar o teor de Se em castanha e sua procedência, castanhas (*sem casca*) da região Oeste da Amazônia, apresentaram menores teores de Se, destacando que a castanha da região Acre-Rondônia tem em média 3,06 mg/kg de selênio, comparada com a da região Manaus-Belém (com casca), que apresentou 36,0 mg/kg (CHANG et al., 1995). Em castanhas do varejo, coletadas na Inglaterra, a média de Se foi de 254 (85-687 $\mu\text{g}/100\text{g}$) (BARCLAY et al., 1995) e em amostras de Belém (PA) a média foi de 10 $\mu\text{g/g}$ na amêndoa (ANDRADE et al., 1999).

O teor de Se na castanha parece estar associado à fração protéica Se-cystina e Se-Metionina (CHUNHIENG et al., 2004). Em castanhas da Bolívia, compradas na Bélgica, sem casca (pacotes de 250 g), e as com casca, em supermercado nos Estados Unidos (pacotes de 450 g) e casca previamente retirada, foram encontrados resultados de 5,1 $\mu\text{g/g}$ (sem casca) e 49,9 $\mu\text{g/g}$ (com casca). Também se confirmou a associação Se-cistina e Se-metionina (DUMONT et al., 2006). Na caracterização das espécies de Se em castanha-do-Brasil analisada por extração enzimática e microondas foram encontrados na castanha inteira (com casca) 35 mg/kg, descascada (amêndoa) 8 mg/kg, e na casca 2 mg/kg. Apesar do teor de Se na castanha com casca, foi relatado que somente a casca parece não ter valor significativo de Se, de forma a influenciar no resultado, inclusive por não ser comestível (VONDERHEIDE et al., 2002).

Tabela 10. Teor de Selênio em Castanha-do-Brasil

Amostras				Teor Médio de Se mg/kg (Min-Máx)						Autores
Origem	Local de Coleta	Período de Coleta	Total	Quantidade (kg)	Método	Com Casca	Mín.	Máx.	Sem Casca	
Brasil	Belém	- ^a	-	-	AES/ICP	-	-	-	1.0	Andrade et al. (1999)
-	Reino Unido	1993-1994	14	-	HG-AAS	-	-	-	2,54	Barclay; Macpherson; Dixon (1995)
-	Itália	-	-	0.5	CLAE-UV-HG-AFS	-	-	-	82.9	Bodo et al. (2003)
Brasil ^b	Estados Unidos	-	162 ^d	-	Fluorimetria	-	-	0.03	3.06	Chang et al. (1995)
Brasil ^c	Unidos	-	162 ^d	-		-	-	1.25	36.0	512.0
Brasil	-	Abril-Maio 2000	-	-	CLAE-MS	-	-	-	126.0	Chunhieng et al. (2006)
Brasil	Manaus	-	-	0.03	Fluorimetria	-	-	-	19,85	Coutinho, Bittencourt e Cozzolino (2002)
Bolívia	Bélgica ^e	-	-	0.02	ICP-MS	49.9	-	-	-	Dumont et al. (2006)
Brasil	EUA ^f	-	-	0.02		-	-	-	5.1	-
Brasil	EUA	-	-	0.2	SEC ICP MS	35.1	-	-	8.3	Kannamkumath et al. (2002)
-	EUA	-	529 ^d	-	Fluorimetria	-	-	-	29.6	Palmer, Herr e Nelson (1982)
-	EUA	-	-	-	CLAE/ICP-MS	35.0 ^d	-	-	8.0	Vonderheide et al. (2002) ^f
-	EUA	-	-	-	Fluorimetria	37.3	0.2	253.0	4.4	Secor; Lisk (1989)
Brasil	Acre	Safra 2001	-	70	HG AAS-ICP	49.9	-	-	5.1	Souza; Menezes (2004)

^a não informado; ^b Acre-Rondônia; ^c Manaus- Belém; ; ^d Castanhas individuais; ^e ND: não detectado; ^f somente casca: 2.0 mg/kg

Por outro lado, o consumo de nozes em geral tem aumentado por parte de grupos específicos da população, como por exemplo, atletas e idosos, em busca do efeito antioxidante de alimentos, com recomendação de consumo de 30g/dia, ou seja, 3 nozes/dia (CRISHOLM et al., 2005). Entretanto, o teor elevado, porém heterogêneo, de Se/amêndoa, no caso da castanha-do-Brasil, dificulta a definição da quantidade adequada de ingestão, objetivando as propriedades antioxidantes, para atender a ingestão diária recomendada (IDR) de Se de 55 µg/dia para adultos (NAS, 2000).

Em estudo do consumo de alimentos, por grupos específicos da população brasileira quanto ao teor de Se, foi observado o consumo de 26,3 µg/dia para crianças da cidade de São Paulo e 37,4 g/dia para crianças da cidade de Belém-PA, demonstrando que pode haver maior ingestão de Se nas populações de áreas em que a castanha-do-Brasil é proveniente, com maior possibilidade de sua presença, nas refeições. Após testes de suplementação com castanha-do-Brasil em capoeiristas, a média de Se encontrada foi 1985,9 µg/100g ou $59,59 \pm 0,411$ µg por noz (de 3 g cada) e relacionando os resultados com atividade antioxidante, recomendou-se o uso do valor médio de 60 µg/amêndoa (3 g) ou 19 µg Se/100g para consumo (COUTINHO et al., 2002).

A dose correta de ingestão diária também é fundamental para evitar não só dosagens tóxicas, mas também o risco de deficiência do micronutriente, cuja ocorrência foi reportada em áreas com solo pobre em Se biodisponível, conhecida como doença de Keshan (HARTIKAINEN, 2005). Algumas recomendações de ingestão estão descritas na Tabela 11, e revela-se a heterogeneidade de teores assumidos nas diferentes fontes citadas.

Tabela 11. Ingestão Diária Aceitável (IDA) de selênio em diversos países

País	Se (µg)	Fonte
Áustria	48	Wilplinger; Sima (1998)
Brasil	60	Coutinho et al. (2002)
Espanha	32.3	Diaz-Alarcon et al. (1996)
EUA	55	NAS (2000)
França	48	Pelus et al. (1994)
Grécia	39.3	Pappa; Pappas; Surai (2006)
Holanda	67	Foster; Sumar (1997)
Inglaterra	34.0	Barclay et al. (1995)
Suíça	70	Foster; Sumar (1997)
Turquia	30	Foster; Sumar (1997)

A utilização de doses correta de Se na dieta é fundamental, pois estudos identificaram que o Se pode interagir com elementos tóxicos, como Hg e Pb, modificar sua toxicidade em diferentes níveis, e prevenir manifestações toxicológicas, devido à exposição a metais (CAMPOS et al., 2002; PINHEIRO et al., 2005; LEMIRE et al., 2006).

2.2.4 Métodos para determinação analítica de selênio

Além dos métodos usualmente utilizados para determinação de Se total em castanha-do-Brasil, como os citados na Tabela 8, outros métodos foram testados para identificar a associação de Se à fração protéica de alimentos. Em determinação em castanha-do-Brasil, com HPLC-ICP-MS, por hidrólise ácida, foram detectados 36,2 µg/g, enquanto que por hidrólise enzimática 12,1 µg/g de Se-metionina em castanha-do-Brasil desengordurada (WROBEL et al., 2003).

Em outro estudo que utilizou como métodos SEC-UV-ICP-MS e CE-ICP-MS, e neste último, o Se estava presente na castanha, principalmente na forma de Se-Metionina (KANNAMKUMARATH; WROBEL; WUILLLOUD, 2005). Utilizando o método de nanoHPLC-ES-Q/TOF MS/MS a fração Se-cisteína também foi menor do que a Se-metionina (DERNOVICS; GIUSTI; LOBINSKI, 2007). Outros procedimentos também têm sido testados para o pré-tratamento da amostra, como por exemplo, o uso de UV e H₂O₂, acoplada a espectrometria de absorção atômica eletro térmica (ETAAS), que permitiu quantificar até 38000 ng/g em castanha com casca coletadas e provenientes do Brasil (MANJUSHA; DASH; KARUNASAGAR, 2007).

2.3 Aflatoxinas

2.3.1 Introdução

As aflatoxinas (AFLs) pertencem ao grupo das micotoxinas e são resultantes do metabolismo de fungos (MOLINEUX et al., 2007). O termo micotoxina deriva do termo grego *mikes* (fungo) e do latim *toxicum* (veneno), ou seja, toxina produzida por fungos em condições específicas (SCUSSEL, 1998) e que têm caráter carcinogênico, mutagênico e teratogênico, com efeitos crônicos ou agudos em animais e humanos (IARC, 1993; BINDER et al., 2007).

As AFLs são as micotoxinas mais estudadas, pois seu descobrimento ocorreu durante o estudo das causas de um acidente econômico, em 1960, na Inglaterra, com a morte de 400.000 perus devido a uma doença sem causa aparente, chamada de *Turkey X Disease*, e que posteriormente foi associada ao consumo de ração contaminada (ZOLLNER; MAYER-HELM, 2006). Em 1961 responsabilizou-se a ração proveniente do Brasil de conter o princípio tóxico causador da doença. Entretanto, o composto foi detectado também em rações de outros países. Estudos em 1962 identificaram a ingestão do alimento contaminado com grande número de hifas de *Aspergillus flavus* como causa da doença, sendo então, um fator tóxico detectado por *Cromatografia em Camada Delgada* (CCD) e denominado de *aflatoxina*. Na detecção foram observados compostos com fluorescência azul e verde, sob luz ultravioleta (UV), isto é, *Aflatoxina B (Blue)* e *G (Green)* e suas frações B₁, B₂, G₁ e G₂, em que AFB₁ é considerado o composto mais tóxico (KELLER; TURNER, BENNETT, 2005).

Dentre as micotoxinas que podem afetar as cadeias produtivas de alimentos e que levam a necessidade de prevenção estão: *sterigmatocistina*, precursora da AFB₁ (VERSILOVSKIS; BARTKEVICS; MIKELSONE, 2007); AFLM₁, derivada da AFB₁ provenientes de espécies de *Aspergillus* (CAVALIERE et al., 2006); *Fumonisin*as, *zearalenona*, *tricotecenos* e *deoxinivalenol* resultantes do metabolismo de espécies de *Fusarium* (SONGSERMSAKUL et al., 2006; CAVALIERE et al., 2007a; KRŠKA, et al., 2007); *Ochratoxina*, resultante do metabolismo de *A. ochraceus*, (TOPFER et al., 2007); Alcalóides do *Ergot*, produzido pelo gênero *Claviceps* (MOHAMED et al., 2006) e *Patulina*, produzida por *Penicillium* (MORALES et al., 2007).

As AFLs são polipeptídios derivados de difuro-furanocumarinas complexas com intensa fluorescência em determinados comprimentos de onda, instáveis à luz, e degradáveis em temperaturas acima de 100°C (GOWDA et al., 2007; KLISCH, 2007). São substâncias apolares, solúveis em solventes como o clorofórmio, metanol e acetonitrila, com estrutura composta de anéis bi-furano, e diidrofurano e tetrahidrofurano ligados a cumarina (YU et al., 2004; BLESA et al., 2005). As estruturas químicas das principais AFLs estão representadas na Figura 6.

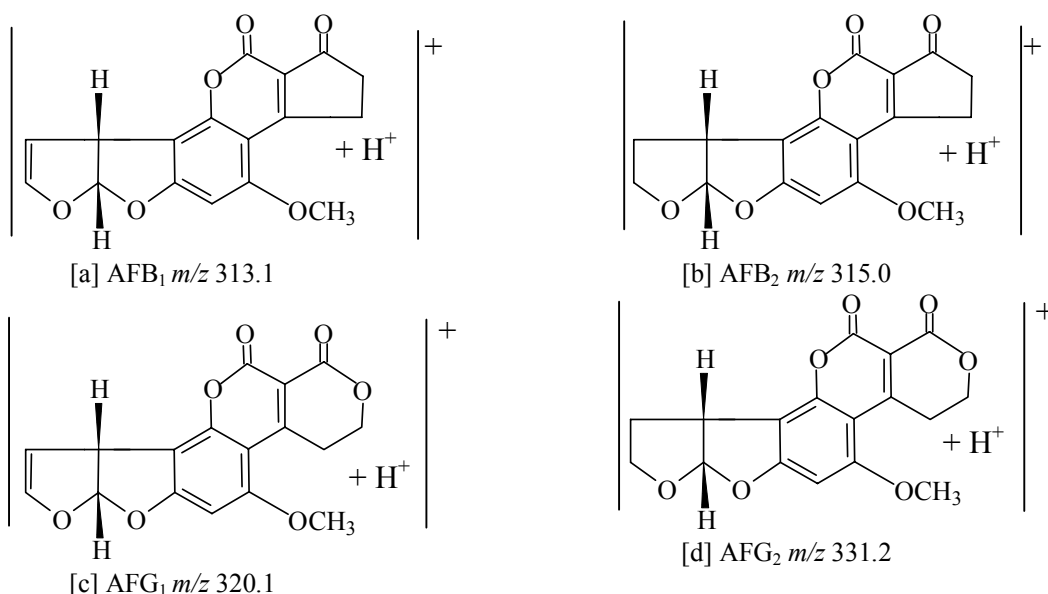
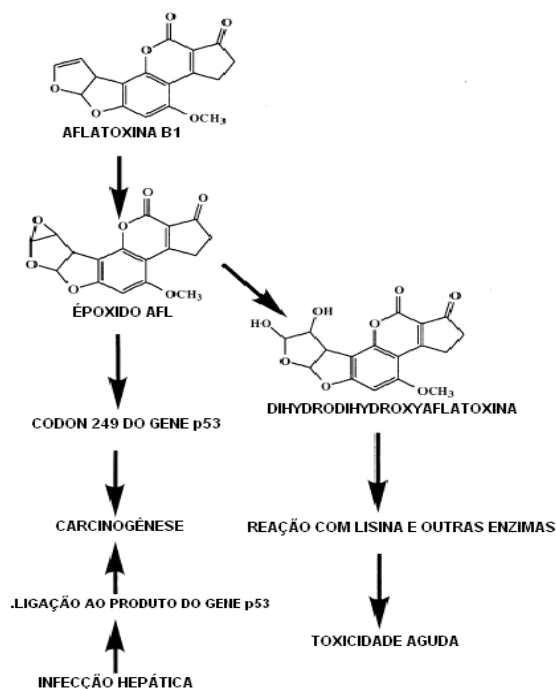


Figura 6. Íon molecular protonado de aflatoxina $[M+H]^+$ at [a] m/z 313.1, [b] m/z 315.0, [c] m/z 329.1 e [d] m/z 331 de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, respectivamente Xavier; Scussel (2007)

A síntese das AFLs ocorre por uma cadeia metabólica de polipeptídios, resultantes de conversões enzimáticas, em que, enzimas atuam na conversão de acetil coenzima A até o produto final AFL (YABE; NAKAJIMA, 2004; MISHRA; DAS, 2007). De acordo com o sequenciamento genômico de *A. flavus*, os genes envolvidos, como fatores de transcrição, na cadeia de biossíntese de AFLs estão agrupados, e, em geral, consistem em 25, medindo aproximadamente 70 kb (BHATNAGAR et al., 2006). Os genes que mais contribuem com a patogenicidade de *A. flavus* em humanos e animais estão expressos em mamíferos à temperatura ambiente e a toxicidade e carcinogenicidade de AFB₁ está diretamente ligada à bioativação resultando em um composto altamente reativo denominado de AFB₁ 8,9-epóxido. A molécula possui dois sítios associados à toxicidade: o primeiro ligado à posição da dupla ligação do anel furano e o segundo a reatividade do grupo do anel lactona (facilmente hidrolisado e vulnerável à degradação) no meio da estrutura cumarina.

A bioativação, ocorre primeiramente por isoenzimas, em que a principal é a citocromo P450 (CYP450) dependente da epoxidação do terminal do anel furano e responsável por acoplar a macromoléculas como DNA, RNA e outras proteínas. Acredita-se que os danos às células resultam da formação de aductos de DNA (forma oxidada) de AFL B₁-8,9-epóxido com átomo de guanidina N₇. Em consequência, o consumo de alimentos contaminados pode causar efeitos agudos e crônicos, ligados a biotransformação das AFLs no composto 8,9 epóxido. Outra ação alternativa de AFB₁ é a formação de aflatoxicol mediada por redutase e o produto reconvertido em AFB₁ pela dehydrogenase, de forma que o composto aflatoxicol parece ser o principal reservatório de AFB₁ em alguns organismos (LEE et al., 2001).

Os tratamentos de detoxificação para eliminação/redução de AFLs parecem remover a dupla ligação do anel furano terminal ou promover abertura do anel lactona. Com isso, outras reações poderão ocorrer e alterar a ligação de AFLs do anel furano terminal ao DNA e proteínas (BASAPPA; SANTHA, 1996). As enzimas P450 também parecem ser responsáveis pela detoxificação de AFLs em organismos, formando compostos menos tóxicos, que assim como o composto epóxido, podem ser excretados do organismo, na forma conjugada com proteínas e/ou glutathiona (MISHRA; DAS, 2007). O esquema da ação tóxica a partir de AFB₁ está na Figura 7.



Moss (2002)

Figura 7. Esquema da formação do composto de ação tóxica a partir da aflatoxina B₁

2.3.2 Toxicidade das aflatoxinas

As AFLs absorvidas pelo organismo são distribuídas na corrente sanguínea e seguem diretamente para o fígado, devido ao efeito de primeira passagem, onde parte passa por biotransformações e poderá ser encontrada no sangue, cabelo, tecidos e produtos de excreção (CAVALIERE et al., 2006; JOLLY et al., 2006).

A ação biológica da AFB₁ ligada à formação do composto 8,9-epóxido ocorre por meio de biotransformação hepática, em reações de fase I e II, em que algumas delas ativam o composto, enquanto outras reduzem sua toxicidade. Com exceção da formação do aflatoxicol, que é produto de enzimas da fração citossol do hepatócito, as demais reações são catalisadas por isoenzimas da fração microssômica hepática. A alta concentração do composto no fígado pode ser explicada pela alta permeabilidade da membrana do hepatócito, nos primeiros processos de biotransformação, requisito para sua carcinogenicidade e pela ligação covalente com macromoléculas hepáticas.

Na circulação sistêmica, são distribuídas no organismo ligadas a componentes sanguíneos, tais como eritrócitos e proteínas plasmáticas, de forma que produtos do metabolismo (principalmente leite e ovos) apresentarão invariavelmente teores, significativos com risco para a população que os ingere. Os efeitos que as AFLs podem causar no homem e animais dependem da dose, frequência de consumo, espécie/sexo, idade e do estado nutricional e podem ser *agudo* (letal ou não) ou *subagudo*. O efeito *agudo* é de percepção rápida e pode levar o animal à morte, por danos irreversíveis, devido à ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito *subagudo* é resultado da ingestão de doses menores, e causa distúrbios nos órgãos humanos e de animais, especialmente no fígado. As AFLs podem provocar: cirrose, necrose do fígado, *Síndrome de Reye* (encefalopatia com degeneração gordurosa do cérebro), hemorragias nos rins e lesões na pele, e podem interferir no sistema imunológico, diminuindo a resistência às doenças (MOSS, 2002; RASTOGI et al., 2006). Há, ainda, relação comprovada entre AFLs e a incidência de hepatite B e “Kwashiorkor” bem como risco de desenvolvimento de câncer (SIBANDA; MAROVATSANGA; PESTKA, 1997; EGAL et al., 2005).

O uso de biomarcadores para estudar a exposição da população às AFLs, bem como ao consumo de alimentos possivelmente contaminados por fungos aflatoxigênicos, é uma ferramenta utilizada para avaliar grupos de consumidores em que a incidência de câncer e hepatite tem sido freqüente (WILD et al., 2002)

2.3.3 Fatores que influenciam a produção de aflatoxinas

Alguns fatores intrínsecos dos alimentos, como a *composição nutricional*, o *teor de umidade e atividade de água* (a_w) podem fornecer substratos para fungos produtores de AFLs. Outros fatores (externos) como: temperatura, umidade relativa (UR %) tempo de armazenagem, microclima, competição entre espécies de fungos, e uso de fungicidas, também necessitam ser controlados para a segurança do alimento (KABAK, DOBSON; VAR, 2006; KLISCH, 2007).

Fatores Intrínsecos

A *composição nutricional* dos alimentos, que inclui proteínas, carboidratos, lipídios e outros componentes, inclusive antioxidantes, influenciam diretamente na curva de crescimento dos microrganismos, assim como na natureza do processo de deterioração dos alimentos e possível produção de AFLs. As características genéticas de algumas plantas, especificamente no caso de nozes, também possuem maior resistência a ação de insetos, contaminação fúngica e conseqüente produção de AFLs (KABAK; DOBSON; VAR, 2006).

Outro fator no desenvolvimento de fungos em alimentos é o conteúdo de *umidade*, que é usualmente expresso em termos de umidade absoluta do material e das exigências mínimas apresentadas pelos fungos com relação ao seu desenvolvimento. Em geral, os fungos são mais tolerantes que as bactérias aos meios com baixa umidade. Entretanto, este fator, não garante armazenagem segura, pois outros fungos podem crescer e liberar água e calor, aumentando a temperatura e umidade nos grãos adjacentes. Então, é fundamental manter um baixo teor de umidade (< 1-2 %) na armazenagem, secagem homogênea e aeração dos grãos, e estender o princípio de adequada ventilação para a qualidade dos produtos, no que diz respeito ao metabolismo das nozes, por exemplo, e dos fungos (LORINI, 2002).

O teor de *atividade de água* (a_w) também pode interferir no metabolismo de fungos já que é medido em escala de 0 a 1 (relação entre a pressão de vapor da água no alimento e a pressão de vapor da água pura) e reflete o grau em que a água está ligada aos componentes do substrato, não se encontrando disponível para as reações bioquímicas e para o crescimento de microrganismos. A maioria das leveduras não cresce em a_w abaixo de 0,65 e os fungos em a_w abaixo de 0,70. Com poucas exceções, é possível afirmar que alimentos desidratados serão estáveis, à deterioração por microorganismos, quando $a_w < 0,70$ (CODEX ALIMENTARIUS, 2006), apesar de que as reações químicas e enzimáticas prosseguem até a_w próximo de zero. Quanto ao *pH* (potencial hidrogeniônico), há microrganismos menos tolerantes aos meios ácidos. Os fungos, entretanto, têm condições favoráveis em $pH < 4,5$. A faixa de pH ótimo, para a formação das AFLs e o crescimento do fungo é principalmente de 5 a 6.

O *potencial de oxi-redução*, por sua vez, representa a disponibilidade de O_2 no alimento, e, nesse aspecto, o potencial dos fungos pode ser: *aeróbio* (+); *anaeróbio* (-) e *facultativo* (tolerantes a presença ou ausência de O_2). Cepas de *A. flavus* demonstraram ser altamente influenciadas, pela associação de pH e a_w , em temperaturas específicas, quanto à produção de AFLs (ARRUS, 2005b).

Fatores Extrínsecos

A *temperatura* é o fator que interfere mais diretamente no desenvolvimento fúngico, pois é menos restritiva que a umidade. Várias espécies de fungos crescem durante a armazenagem com média de 30°C (ambiente), em regiões tropicais, mesmo que sejam afetadas por outros fatores. O teor de UR %, por sua vez, é a umidade de equilíbrio entre o ambiente e o alimento, e é expressa por: $UR = a_w \cdot 100$. Em condições de equilíbrio, relaciona-se a_w com UR %, resultando em ganho ou perda de umidade do produto, favorecendo ou impedindo a proliferação de fungos (ARRUS, 2005a).

O crescimento de fungos depende também do *microclima* que envolve o substrato, tais como, o ambiente gasoso (composição da atmosfera gasosa). Alguns fungos podem crescer em baixas concentrações de O_2 sendo afetados somente em concentrações inferiores a 0,2 %, ocorrendo pouco crescimento em ambientes com

dióxido de carbono (CO₂) ou nitrogênio (N₂) (SCUSSEL, 1998). Portanto, misturas de gases podem ser usadas para reduzir a concentração de O₂. Ambientes com atmosfera controlada/modificada também têm sido estudados durante o transporte e armazenamento de alimentos para prevenir o crescimento e formação de toxinas. (ELLIS et al., 1993).

O *tempo de armazenamento* do alimento pode favorecer o desenvolvimento de fungos, que exigem umidade baixa e tempo prolongado para que seus danos sejam observados. Da mesma forma, a *competição com a flora deteriorante* também tem sido estudada em várias nozes, inclusive com objetivo de inibir cepas aflatoxigênicas de alguns fungos (LOPEZ et al., 2000; CANDLISH et al., 2001). A preocupação com a flora microbiana de nozes, por exemplo, tem aumentado, devido ao grande volume de comercialização desses produtos, e tem gerado, inclusive, novos métodos de detecção e inibição de fungos e AFLs (SIMSEK; DEMIR, 2002; ROJAS-DURAN et al., 2007).

Mesmo considerando que as AFLs são substâncias termoestáveis e que os processos de detoxificação, aumentam custos no processamento de alimentos, alguns métodos foram testados para inibição do fungo e produção da toxina em alimentos, como por exemplo, substâncias químicas e processos tecnológicos. Dentre essas alternativas há o uso de substâncias naturalmente presentes em plantas, como por exemplo: antioxidantes, eugenol, mentol e biflavonóides (SANTOS; ALVES; VALE, 2000; GONÇALEZ; FELICIO; PINTO, 2001; LEE et al., 2001). Há ainda substâncias produzidas por cepas de *Streptomyces*, interação/competição com outras cepas e adição de substâncias químicas artificiais (SAKUDA et al., 1996; MARTINS; MARTINS; BERNARDO, 2000; PASSONE et al., 2007).

Testes de aquecimento e radiação no preparo/industrialização de alimentos também foram usados para diminuir/prevenir a flora fúngica presente e a contaminação por AFLs. Entretanto alimentos nutricionalmente ricos, ao receberem tais processos tecnológicos como tentativa de detoxificação, tiveram as qualidades nutricionais ou organolépticas alteradas (AZIZ; MOUSSA, 2002; AMJAD; KHALIL; HAMIDULLAH, 2006; HWANG; LEE; JUN-HO, 2006).

O uso de atmosfera controlada/modificada, como a redução de O₂ (vácuo) ou adição de gases, também podem ser úteis para ampliar a vida-de-prateleira dos alimentos e normalmente é aplicada em associação com outros fatores de proteção, como por exemplo, embalagens especiais e temperaturas específicas (GAMLI; HAYOGLU, 2007). Dentre os principais gases utilizados estão: CO₂, N₂, CO e SO₂, sendo que o mais comum, e talvez mais eficiente parecesse ser o CO₂. Em testes com castanha-do-Brasil sem casca, fechada em latas após recravação, avaliadas no tempo inicial e armazenadas por 120 dias, apesar de não ter sido evidenciado a presença de bolores e leveduras, houve decréscimo do número de bactérias mesófilas aeróbicas e anaeróbicas facultativas de $1,2 \times 10^4$ UFC/g para $5,3 \times 10^3$, após o período de armazenamento. Foi evidente que o método de preservação utilizado foi eficiente para diminuir as modificações na qualidade do produto (SOUZA, 1987).

O uso de vácuo também pode inibir o crescimento fúngico em alimentos, entretanto algumas cepas têm capacidade de crescer nessas condições (TANIWAKI et al., 2001). De forma, que normalmente a redução de O₂ é associada a outros mecanismos, como a adição de CO₂ (100 %) que, em anaerobiose e baixa a_w, inibiu crescimento de *A. niger* (HALOUAT; DEBEVERE, 1997). Além da proteção microbiológica, o uso de mistura de gases demonstrou pode ser uma ferramenta para aprimorar características organolépticas de alimentos (gosto e aroma) e estender a vida de prateleira.

ELIS et al., (1993a) identificaram efeito inibitório na produção de AFLs devido a sinergia entre condições específicas de a_w, pH, temperatura de estocagem, como fatores associados a redução dos níveis de O₂ em conjunto com elevação de dióxido de carbono (CO₂). Adicionalmente, foi observado que a efetividade dessas barreiras de proteção aos alimentos foi diretamente influenciada pelo tamanho do inóculo (números de esporo) de fungos presentes. No estudo, o baixo teor de O₂ parece ter apresentado maior efeito redutor sob o crescimento de inóculo com grande número de *A. flavus*. Desta forma, concluiu-se que a qualidade do produto será ampliada quando este for produzido sob boas condições de fabricação (ELIS et al., 1993b).

As embalagens (filmes com diferentes camadas) são barreiras físicas que também podem permitir modificações nas características dos alimentos. No caso de testes em amendoim, o crescimento fúngico e produção de AFLs foram inibidos quando aplicada uma mistura de gases ($\text{CO}_2:\text{N}_2$ (65:35)), mas o efeito antifúngico da redução de O_2 e aumento de CO_2 foi dependente dos tipos de filmes de embalagens, especialmente em altas temperaturas (ELIS et al., 1994). Outro método é o uso de vapor de óleo essencial de plantas, como, por exemplo, canela e cravo, que demonstraram em embalagem com O_2 (<0.5-10 %), CO_2 (20-40%) e na quantidade de 2000 μL capacidade de inibir *A. flavus* e outros fungos. Na aplicação de óleo essencial de mostarda, as cepas de *A. flavus* testadas, foram mais resistentes à inibição, demonstrando que a efetividade antifúngica desse mecanismo está diretamente relacionada com a natureza do alimento e extensão da superfície de contato do vapor de óleo utilizado (SUHR; NIELSEN, 2005; MATAN et al., 2006).

2.3.4 Métodos para determinação analítica das aflatoxinas

Desde a década de 1960, em que a cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada na detecção de AFLs, os avanços foram significativos, quanto ao surgimento de novos métodos analíticos. Da mesma forma, os estudos sobre amostragem, preparo da amostra e validação têm sido fundamentais, para que os resultados sejam mais precisos (GILBERT; ANKLAN, 2002; WHITAKER, 2003).

Além da CCD, outros métodos atuais se destacam: fluorimetria (FL), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS), imunoensaios (ELISA), cromatografia de imunoafinidade (IAC), assim como vários métodos químicos e/ou físicos para detoxificação (AOAC, 2005; PATERSON, 2006; SAPSFORD et al., 2006; XIULAN et al., 2006; REN et al., 2007; MISHRA; DAS, 2007). O método de LC MS/MS tem sido usado não só para AFLs e outros compostos produzidos por cepas aflatoxigênicas em alimentos, mas também para muitas outras micotoxinas e matrizes (RUNDBERGET; WILKINS, 2002; ZOLLNER; MAYER-HELM, 2006). Normalmente é associado à CLAE e baseado na capacidade da câmara de colisão do detector permitir que íons admitidos no sistema, colidam com as moléculas de um gás inerte (usualmente Argônio) resultando em dissociação dos íons. Os produtos da dissociação (íons pais) podem ser detectados para assegurar a origem de um íon

em particular, que está no meio de muitos outros íons. A partir destes fragmentos, a célula de colisão, que opera de forma linear, produz um espectro de massa (íons filhos). O método de LC-M/MS com equipamento triplo quadrupolo, por exemplo, tem dois modos de ionização: *electrospray* e *atmospheric pressure chemical ionization*-APCI (WATSON; ATSRIKU; OLIVEIRA, 2003). Além da rapidez, sensibilidade e de não exigir pré-tratamento em amostras e pode ser aplicado em matrizes complexas, como as nozes (CHUN et al., 2007). Foi utilizado em leite, azeite de oliva e amendoim, com a vantagem de que o LOQ foi menor que nos métodos tradicionais, e atende os limites exigidos por várias legislações (BLESA et al., 2005; CAVALIERE et al., 2007).

2.3.5 Legislação nacional e internacional para aflatoxinas

Diversas tentativas de harmonização da legislação para micotoxinas em alimentos têm sido feitas em vários países. De forma que, diretrizes foram estabelecidas referentes aos métodos de amostragem, análises e limites de aceitabilidade para o controle oficial de contaminantes em alimentos, incluindo as nozes de árvores e a castanha-do-Brasil (EU, 1998).

Como legislação brasileira, o Ministério da Saúde estabeleceu em 1977, a Resolução N°34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), como o limite máximo aceitável de aflatoxinas para alimentos, de $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$, e este parâmetro foi adotado pela fiscalização para cada lote de castanha-do-Brasil, com ou sem casca (BRASIL, 1976).

Embora a Bolívia, seja o país que mais exporta castanha-do-Brasil beneficiada, sendo inclusive a maior parte importada do Brasil como matéria prima, não possui legislação para micotoxinas. Entretanto, o Peru, outro país exportador, estabelece um limite máximo de $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para todos os alimentos (VAN EGMOND; JONKER, 2005; PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Em 1998, a União Europeia (EU), por meio da Diretiva 98/53/CE (EU, 1998) estabeleceu exigências referentes aos métodos de colheita de amostras e os métodos de análises para o controle oficial de teores de certos contaminantes em alimentos, incluindo aflatoxinas e a castanha-do-Brasil a serem cumpridas. Já em

2001, por meio do Regulamento N°466/2001/EC foi estabelecido o limite máximo de aflatoxinas para castanha-do-Brasil destinada ao mercado europeu, com redação no Regulamento CE N°563/2002, fixando os limites de aflatoxinas em: $2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFB_1) ou $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ($\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$) e em 2003, por meio da Directiva 2003/494/EC, estabeleceu condições especiais à importação de castanha-do-Brasil com casca, do Brasil (EU, 2003). Isto levou o governo brasileiro a definir legislações com normas para cadeia produtiva, envolvendo a amostragem (coleta, preparo e tamanho da amostra), método analítico e de preparo, bem como diretrizes para aplicação dos princípios das boas práticas de fabricação/manejo (BPF/BPM) e do sistema de análises e pontos críticos de controle (APPCC) pelos extrativistas e usinas de beneficiamento (BRASIL, 2004).

Para as nozes de árvores há uma tentativa de harmonização quanto ao teor máximo aceitável de aflatoxinas, por parte do *Codex Alimentarius*, que envolveu a castanha-do-Brasil, a partir de 2000. O código de práticas inclui mecanismos para diminuição dos riscos de contaminação na cadeia produtiva, resultando em um documento, denominado de “*Code of Practice for the Prevention and Reduction of Aflatoxin Contamination in Tree Nuts*” (CODEX ALIMENTARIUS, 2006). Níveis de tolerância para AFLs harmonizados para alimentos estão sendo fixados e são encontrados, principalmente, em zonas de comércio livre, como EUA, Mercosul, Austrália/Nova Zelândia (VAN EGMOND, 2005). Como ainda não há harmonização dos limites de AFLs em castanha-do-Brasil para todos os países importadores, na Tabela 12, estão citados os limites máximos permitidos utilizados em alguns países, incluindo a América Latina e Mercosul, para AFLs em alimentos em geral.

Tabela 12. Limites máximos permitidos para aflatoxinas em alimentos em diversos países

País	Limite máximo ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Alimentos
África do Sul	5 (AFB ₁) 10 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Todos os alimentos
Austrália	5 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Todos os alimentos
Canadá	15 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Nozes e produtos
Estados Unidos	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Todos os alimentos
Filipinas	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Nozes e seus produtos
Índia	30 (AFB ₁)	Todos os alimentos
Israel	5 (AFB ₁) 15 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Nozes, amendoim, farelo de milho, figos e seus produtos
Japão	10 (AFB ₁)	Alimentos em Geral
Nova Zelândia	5 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Todos os alimentos
União Européia	2 (AFB ₁) 4 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Amendoim, nozes em geral e frutas secas para consumo direto ou como ingrediente de alimentos
América Latina		
Argentina	Zero (AFB ₁) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 5 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 30 AFB ₁	Alimento infantil Derivados de amendoim Milho Farinha de Soja
Brasil	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Amendoim (<i>toasted, roasted</i> , com/sem pele) Pasta de amendoim Farinha de milho Milho (integral/quebrado/moído) (integral/ sem gérmen)
Bolívia ^a	NH ^b	NH ^b
Colômbia	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 10 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Alimentos Cereal (sorgo, mileto) Oleaginosas Sementes de gergelim
Mercosul	20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Amendoim (com/sem pele) Amendoim (torrado) Pasta de amendoim Farinha de milho (integral/sem germen) Milho Corn meal
Peru	10 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Alimentos
Suriname	5 AFB ₁ 5 AFB ₁ 30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Amendoim Produtos de amendoim Leguminosas Milho
Uruguay	30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 20 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 30 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 10 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂) 3 (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	Amendoim Produtos de amendoim Alimentos e Especiarias Derivados de soja Frutas secas Côco Alimento infantil

PACHECO; SCUSSEL (2006)

^a maior exportador de castanha-do-Brasil^b não há legislação

2.4 Contaminação da castanha-do-Brasil por fungos e aflatoxinas

Tem sido encontrada, freqüentemente, associação de diversos fungos, e alguns aflatoxigênicos, com as “nozes de árvores”, incluindo a castanha-do-Brasil (BAYMAN et al., 2002). Os primeiros relatos de problemas da segurança toxicológica da castanha-do-Brasil datam da década de 60, em que foi relatada a “podridão da castanha” causada por fungo do gênero *Aspergillus* (ALMEIDA, 1963), assim como casos de associação de *A. flavus* com AFLs em castanha-do-Brasil na Inglaterra (MENESES, 1968).

2.4.1 Fatores ambientais da região Amazônica versus fungos e aflatoxinas

Na floresta Amazônica, os fatores que influenciam o fungo na produção de AFLs estão presentes em maior ou menor escala, de forma que é necessário que desde a disposição dos ouriços na floresta, até o beneficiamento seja evitado favorecer as condições necessárias às cepas aflatoxigênicas (CAMPO/PAS, 2004).

Dentre os fatores intrínsecos que podem afetar a produção de AFLs em castanha-do-Brasil há o pH, levemente ácido (5,6 a 6,0), possibilita um ambiente favorável ao desenvolvimento dos fungos. Quanto ao potencial de oxi-redução e consumo de oxigênio, observou-se que mesmo a castanha descascada embalada a vácuo pode apresentar contaminação por leveduras remanescentes do beneficiamento (PACHECO, 2003). Por sua vez a manutenção do teor de a_w , de 0,65 a 0,70, evita a produção da AFLs, e é necessário em todas as etapas da cadeia produtiva, especialmente em condições ótimas de a_w às espécies de *Aspergillus flavus* (0,83-0,87) e *parasiticus* (0,78-0,80) (ARRUS, 2005a).

Danos mecânicos podem ocorrer nas castanhas (a) na floresta durante a queda do ouriço e do corte para retirada das castanhas, pela ação de roedores (cotia) e pássaros (arara) e pela ação de insetos (b) durante o transporte pela floresta até as cidades de armazenagem e após, até as usinas (c) nas usinas de beneficiamento (da recepção ao produto seco) (PACHECO; SCUSSEL, 2006). Eles favorecem a absorção de umidade e facilitam a invasão, penetração e proliferação dos esporos de fungos no interior altamente nutritivo. Isto pode ocorrer também quando as castanhas já estão embaladas durante o carregamento e descarregamento de *big bags* no navio e no transporte até a chegada no país importador, levando ao

desenvolvimento de fungos e produção de toxinas (Tabela 13). Contudo o uso de vácuo eficiente no beneficiamento pode reduzir a velocidade da proliferação (PACHECO, 2003).

Tabela 13. Ocorrência de danos em castanha-do-Brasil e suas causas

Local	Causa
Na floresta	Queda de ouriços Quebra do ouriço p/extração das sementes Ação de insetos (cupim e formigas) em ouriços deixados no solo
Durante o transporte	Movimento dos lotes nas descargas de barcos e/ou caminhões
Usina de beneficiamento	Movimento do secador rotativo (castanha com casca durante a secagem Amêndoas no descasque e secagem
No porto	Quebra mecânica no embarque/desembarque dos <i>big bags</i> no navio

PACHECO; SCUSSEL (2006)

Durante a secagem da castanha pode ocorrer variação na temperatura, com distribuição heterogênea do calor/vapor no interior da massa de castanha (dentro dos secadores). Isto pode levar à secagem deficiente e conteúdo de umidade heterogêneo das castanhas, e problemas na armazenagem e transporte devido à: (a) conteúdo de umidade variável, por secagem ineficiente; (b) presença de umidade secundária, devido à precipitação ou absorção dos vapores de água no lote parado; (c) difusão do calor e umidade em castanhas não completamente secas, causado por gradiente de temperatura; (d) atividade vital de microrganismos, aumentando a temperatura e o conteúdo de umidade no interior na massa de castanhas não completamente secas e (e) mistura de lotes com umidades diferentes. Contudo, o tempo entre o transporte até o porto, armazenamento e viagem até os países importadores - de lotes de castanhas com umidade não homogênea - pode favorecer proliferação fúngica. A estabilidade da castanha, quanto à umidade é considerada segura quando seca abaixo de 13 % ou seja, abaixo da umidade crítica 15 % (BRASIL, 2004; CAMPO/PAS, 2004).

A presença de insetos, que levam a ruptura da casca, causa absorção de umidade, ainda no ouriço e pode ocorrer também infestação de formigas e cupins ainda no solo da floresta (SIMÕES, 2004). Importante salientar que a etapa de lavagem das castanhas ainda na floresta deve ser evitada, pois a superfície de contato das castanhas é favorável à contaminação por fungos, e o processamento deve ocorrer no menor tempo possível, tão logo as castanhas cheguem à usina, para não haver condições favoráveis aos fungos para síntese das AFLs (BRASIL, 2002).

A atividade de água (a_w), por sua vez, é muito importante por refletir o grau em que a água está disponível para as reações bioquímicas, já que na casca da castanha há fungos que toleram $a_w < 0,70$ (ARRUS, 2005a). Amêndoas de castanha-do-Brasil desidratadas (até 3 %), portanto embaladas em a_w abaixo do nível crítico ($<0,70$), permanecem durante todo o armazenamento estáveis, principalmente se embaladas em sacos de polietileno com baixa permeabilidade a oxigênio e à vácuo. Nessas condições sua estabilidade se prolonga por até 180 dias, independente do processo de secagem utilizado (SILVA; MARSAIOLI, 2003).

O tempo que a castanha fica armazenada pode favorecer o desenvolvimento de fungos principalmente na floresta e no transporte nos barcos. O gênero *Aspergillus* demonstrou em diversos estudos estar sempre associado, inclusive em castanhas submetidas ao tratamento térmico e somente em amostras pré-beneficiadas foi detectado *Fusarium* (Tabela 13). O período na floresta até o beneficiamento, ou seja, entre extração/coleta até o transporte, em embarcações ou caminhões, ocorre em ambientes com elevada umidade relativa e pode ser superior a 50 dias. Considerando as condições de temperatura e umidade ambiente da região, mesmo a armazenagem por 30 dias ou mais prolongada, pode ser considerada preocupante e, portanto, necessita de procedimentos para controlar a proliferação de fungos (BRASIL, 2002).

2.4.2 Fungos e aflatoxinas em castanha-do-Brasil

a) Fungos

Amêndoas de castanha testadas permaneceram estáveis durante 180 dias de armazenamento, após desidratadas a 3 %, embaladas a vácuo em sacos transparentes de polietileno (com baixa permeabilidade de O_2) e índices de a_w abaixo do nível crítico (0,60) (SILVA; MARSAIOLI, 2003). O elevado teor lipídico (68,2 %) da castanha-do-Brasil pode torná-lo muito susceptível a rancificação. Além disso, fungos produtores de AFLs usam glicerina (componente dos óleos) como fonte de calor. A castanha também é rica em açúcares, principalmente a sacarose, e tem dentre os ácidos graxos presentes em ordem decrescente, os monoinsaturados, polinsaturados e saturados na proporção de 25,8; 23,0 e 16,6 %, respectivamente

que podem ser utilizados por fungos. Quanto aos fatores extrínsecos, a alternância de períodos de chuva e sol da região Amazônica, por sua vez, dificulta o controle dos fatores extrínsecos determinantes para o metabolismo de cepas aflatoxigênicas, como a temperatura e a umidade (CAMPO/PAS, 2004). Da mesma forma, elevadas temperaturas (de 30 a 40°C) e UR entre 60 e 90 %, associam-se com a produção de AFLs em nozes (SCUSSEL, 1998).

O efeito de diferentes UR % e temperaturas na produção de AFLs, em castanha-do-Brasil processada, foi efetivo para controlar a contaminação abaixo de 4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (ARRUS et al., 2005), que parece ser favorecida entre 27 e 30°C (CAMPO/PAS, 2004). Variações na temperatura causam secagem deficiente e levam as castanhas a teores heterogêneos de umidade, durante sua armazenagem no beneficiamento. A vantagem é que o período não é prolongado (<30 dias), variando conforme a usina. Da floresta até o beneficiamento, entretanto, o período entre coleta e transporte, superior a 45 dias evidencia-se como preocupante.

A armazenagem é considerada uma etapa crítica, pois dependendo de sua duração e condução, poderá ocorrer o desenvolvimento do fungo e a produção de AFLs (CAMPO/PAS, 2004). É necessário manter o controle da UR % pois se as castanhas estiverem em ambiente com UR % que corresponda à a_w inferior à do alimento, tenderá a desidratar-se, e, se superior tenderá a absorver água. Consideram-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* os principais envolvidos com castanha-do-Brasil. Entretanto, nem sempre a presença de fungos aflatoxigênicos está diretamente relacionada à presença da AFLs em castanha-do-Brasil, pois em amostras coletadas diretamente da floresta havia ausência de AFLs, apesar da presença de cepas aflatoxigênicas (CARTAXO et al., 2004; ARRUS et al., 2005a).

Foram identificadas espécies de *Aspergillus* em castanha de unidades de beneficiamento (SOUZA et al., 2003) e em castanha com casca adquirida no varejo (BAYMAN et al., 2002). Já em amostras (quatro pacotes de 500 g) procedentes de feira de Belém-PA, além de bolores, foram identificadas leveduras, como por exemplo, *Pichia* sp e *Rhodotorula* sp. (FREIRE; OFFORD, 2000). Alguns dos fungos isolados em castanha-do-Brasil estão sumarizados na Tabela 14.

Tabela 14. Fungos identificados em castanha-do-Brasil in natura e pós-processamento com e sem casca, reportados na literatura

Tipo de Castanha	Procedência	Local de Coleta	Nº Amostras	Fungos	Autores
[A] NÃO PROCESSADA(Com Casca)					
[A.1] Da Floresta	Peru Acre Amazonas	Peru Acre Amazonas	15 ^a 4 ^b - ^d	<i>A. wentii</i> , <i>Penicillium</i> sp <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> <i>Aspergillus zonatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. awamon</i> , <i>A. ficum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>A. fetidus</i> , <i>A. flavofurcatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. pulverulentus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>Fusarium</i> sp, <i>Idriella lunata</i> , <i>Glilocadium roseum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Verticidiella</i> , <i>Micelia sterilia</i> . <i>Acremonium strictum</i> , <i>Aspergillus itaconicus</i> <i>A. ficum</i> ., <i>A. japonicus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Cladosporium sphaerospermum</i> , <i>Trichoderma hamatum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. fellutano</i> , <i>Micelia sterilia</i> , <i>Glilocadium viridi</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Eupenicillium</i> , <i>Cylindrocarpon magnusianum</i> , <i>Colletotrichum</i> . <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. viridicatum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Fusarium sacchari</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillidis</i> e <i>Alternaria alternata</i> . <i>Aspergillus</i> , sp., <i>Candida</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp, <i>Fusarium</i> sp, <i>Geotrichum</i> sp, <i>Penicillium</i> sp e <i>Cephalosporium</i> , sp. <i>Phialoopora</i> , sp. <i>Torulopsis</i> sp. <i>trichoderma</i> sp, <i>Verticillium</i> sp	Arrus et al. (2005a) Cartaxo et al. (2003) Simões (2004)
[A.2] Das Comunidades Antes das BPM ^c	Amazonas	Amazonas	-		
Após as BPM ^c	Amazonas	Amazonas	-		
.....	-	-	-		
[A.3] Feira Livre	-	Amazonas	Ouriço		Castrillon e Purchio (1988)
[B] PROCESSADA (Desidratada)					
[B.1] Com casca					
No beneficiamento	-	Amazonas	12 ^e	<i>Pichia</i> sp, <i>Rhodotorula</i> sp, <i>Sacharomyces</i> sp, <i>Candida</i> sp	Pacheco e Scussel (2007) ^c
	Acre	Acre	72 ^f	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Rhizopus</i> sp, <i>Trichoderma</i> sp, <i>Fusarium</i> sp, <i>F. sacchari</i> , <i>T. viridi</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> .	Souza et al. (2003)
	-	Amazonas	30 ^g	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>Fusarium</i> sp, <i>Glilocadium</i> sp, <i>Chalara</i> sp, <i>Syncephalostrum</i> sp, <i>Absidia</i> sp.	Pacheco (2003)
[B.2] Sem casca					
Embalagem Comercial	-	Belém (PA)	2 ^h	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>Pichia</i> sp, <i>Rothayibacter tritici</i> , <i>Rhodotorula</i> sp.	Freire e Offord (2002)
Não-Esterilizada	-	Belém (PA)	2 ^h	<i>B. macerans</i> , <i>B. pumilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Pichia</i> sp.	
Esterilizada ⁱ	-	Belém (PA)	4 ^j	<i>Acremonium curvulum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Exophiala</i> sp, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>Phialophora</i> sp, <i>Phoma</i> sp, <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Scopulariopsis</i> sp, <i>Thielavia terricola</i> , <i>T. citrinoviride</i>	Freire e Kozaiewicz, Paterson (2000)
Não-Esterilizada	-	Califórnia	59 ⁱ	<i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i>	Bayman, Baker, Mahoney (2002)
Esterilizada ⁱ	-	Califórnia	51 ⁱ	<i>A.flavus</i> , <i>A.niger</i> , <i>A.fumigatus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i>	

^a Total de frutos (ouriços) analisados; ^b amostras de 1,5 kg com análises efetuadas em diferentes tempos de armazenamento (0, 30, 60 e 90 dias) em que *A. flavus* e *A. niger* foram predominantes; entretanto com 60 dias houve presença de *F. sacchari* e *F.oxysporum*; ^c Boas praticas de manejo; ^d não informado; ^e 40 kg cada; ^f 1 kg cada; ^g 2,5 kg cada; ^h 2,0 kg cada; ⁱ amostra passou por processo de esterilização antes da análise; ^j 500 g; ^k unidades.

Ouriços retirados da castanheira foram analisados para fungos e AFLs, e não foi detectado ($LD = 1,75 \mu\text{g.kg}^{-1}$) apesar de que, três isolados de *A.flavus* da superfície dos ouriços foram aflatoxigênicos (630 a $915 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (ARRUS et al., 2005a), e em condições de teste de diferentes temperaturas, maiores níveis de AFLs foram encontrados (ARRUS et al., 2005b).

(b) Aflatoxinas

No caso de castanhas provenientes de áreas extrativistas (sem tratamento), e obtidas diretamente nas usinas beneficiadoras foram analisadas por Castrillon (1984) que identificou 3 % de positividade para AFLs, enquanto que Pacheco (2003) identificou 9 % de amostras positivas analisadas, sendo que nenhuma atenderia aos valores aceitos pela União Européia de $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Cartaxo et al. (2003) analisaram AFLs em castanhas da floresta, após caírem ao solo com 0, 30, 60 e 90 dias, de 6 áreas extrativas no Acre, por CCD (sem LD), 1,5 kg de nozes a cada coleta. Não foi detectada AFL em nenhuma das amostras. Entretanto, a aplicação de procedimentos (Boas Práticas de Manejo - BPM) quanto à armazenagem pode influenciar na diminuição da ocorrência de AFL em castanhas ainda nas comunidades extrativistas (SIMÕES, 2004).

Pacheco (2003) não detectou nenhuma amostra AFL positiva, em amostras do beneficiamento (recém processadas) sem casca. Entretanto, Steiner et al. (1992), em outro estudo, com 8 kg de amostras de castanha com casca de um lote de 42.286 kg observou fluorescência das amêndoas e a maior concentração de AFB_1 foi de $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e AFG_1 $1,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Em castanhas obtidas no varejo em Belém (PA) (e separadas em Boa e Baixa qualidade (BQ) por CCD e depois quantitativamente HPLC, após os extratos terem sido purificados em colunas de imunoafinidade para total AFL (Recuperação de 30-45 %). AFL foram detectadas em BQ em nível de $27,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFB_1) e $2,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (AFB_1) (FREIRE et al., 2002). Já em 9 amostras de castanha (varejo) a média de AFL foi de $27 \mu\text{g.kg}^{-1}$ em 33,3 % das amostras (CALDAS et al., 2002).

Na Bolívia, em estudo de material destinado à alimentação animal, elaborado com base em castanha-do-Brasil *in natura* com casca, resultados demonstraram média

de AFL de $301 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ($56\text{-}608 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Foi discutido que a principal causa da contaminação elevada em parte das amostras pudesse estar relacionada com a contaminação por danos na casca ou por insetos, apesar de que a casca, por ser rígida e rugosa pode conferir proteção à amêndoa contra a entrada de microrganismos causadores de contaminação (NAGASHIRO et al., 2001). A presença de danos na casca pode reduzir o risco do consumo de castanha contaminada, pois o consumidor pode ter habilidade de separar visualmente a castanha contaminada independente de sua idade, sexo, instrução ou etnia (MARKLINDER et al., 2005). Em outro estudo castanhas *in natura* (49) e *processadas* (71), analisadas em CCD, a contaminação foi apenas em amostras *in natura* com faixa de 2,4 a $8,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (MORALES; FLORES, 1997).

Em caráter de monitoramento, outros países também têm avaliado a castanha-do-Brasil. Na Inglaterra, em quatro amostras de castanha com casca em quantidades de 1-2 kg, analisadas por CCD, apenas uma amostra apresentou AFB₁ e em nível $<5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (KERSHAW, 1985). Em quatro amostras de castanha coletadas em supermercados japoneses, analisadas por HPTLC com LOD $\sum\text{AFLs } 0,6 \mu\text{g.kg}^{-1}$, apenas 01 amostra apresentou contaminação de $14,5 \mu\text{g.kg}^{-1}\sum\text{AFLs}$, com $10,2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de AFB₁ (TABATA et al., 1993). Em 51 amostras de castanha-do-Brasil com casca (20 kg cada), analisadas na República de Chipre do período de 1992-1996, importadas da Holanda e com LOD de $0,4 \mu\text{g.kg}^{-1}\sum\text{AFLs}$, por fluorimetria seguida de detecção por HPTLC, 10 amostras foram positivas com média de $14,1 \mu\text{g.kg}^{-1}\sum\text{AFLs}$ ($8,3$ a $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (IOANNOU-KAKOURI et al., 1999). Na Suécia, durante o outono de 1996 ao verão de 1998, em 17 amostras comercializadas no varejo e analisadas por CLAE com LOD de $0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para cada AFL, do total, 7 apresentaram AFLs, em que para $\sum\text{AFLs}$, 3 estavam com níveis de 0,01 a $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ e 4 estavam acima de $4 \mu\text{g.kg}^{-1}$, com o maior teor de $2500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (THUVANDER et al., 2001). Devido à complexidade de constituintes nutricionais da castanha-do-Brasil, como por exemplo, proteínas e lipídios, a recuperação analítica das AFLs é considerada em algumas pesquisas, como difícil. Recuperações abaixo de 50 % para B₁, B₂, e G₁ foram utilizadas e até 16,6 % de G₂ (IOANNOU-KAKOURI et al, 1999). De forma a resumir, as várias pesquisas sobre a presença de AFLs em castanha-do-Brasil, foram reunidos alguns dos resultados na Tabela 14.

Tabela 15. Contaminação por aflatoxinas em castanha-do-Brasil

Tipo	Procedência	Local de Coleta	Nº Amostras	Quantidade (Kg)	Σ AFLs (µg/Kg)			Método	Detecção Σ AFLs (µg/Kg)		Autores
					Média	Min.	Máx.		LD	LQ	
[A] Não Processada (crua e com casca)											
A.1: Floresta:	Peru	Ouriço da árvore	15	- ^a	ND ^b	NA	NA	ELISA	1.75	NI	Arrus et al. (2005a)
	Brasil	Chão da Floresta	4	1.5	ND	NA	NA	CCD	NI	NI	Cartaxo et al. (2003)
A.2: Comunidades	Brasil	Após 1 ^a	40	30	4.9	2.0	11.5	LCMS/MS	0.195	0.39	Pacheco e Scussel (2007 ^a)
	Brasil	Estocagem ^c	40	30	2.0	1.2	4.5	LCMS/MS	0.195	0.39	
	Brasil	Após 1 ^a	NI	NI	20.5	0.6	16.0	CCD	0.8	NI	Simões (2004)
	Brasil	Estocagem ^d	NI	NI	1.0	1.0	1.1	CCD	0.8	NI	
	Brasil	Após 1 ^a	NI	NI	105.23 ^g	4.0 ^g	250 ^g	CCD	2.0	NI	Pacheco (2003)
Após 2º Estocagem	Brasil	Embarcações	120	30	11.13	4.8	19.2	CCD	1.5	NI	Pacheco e Scussel (2006)
	Brasil	Porto da usina	16	1							
[B] Processada (Desidratada)											
[B.1] Fábrica Com casca (Tipo Exportação)	Brasil	Área de Expedição ^h	36	12	1.2	1.6	6.0	LCMS/MS	0.195	0.39	Pacheco e Scussel (2007b)
	Brasil	Área de Expedição	3 ⁱ	15	5.616 ^j	NA	NA	LCMS/MS	0.195	0.39	De Mello Robert e Scussel (2007)
	Itália ^l	Expedição	100	0.3	--	1.4	557	HPLC	NI	NI	Marklinder et al. (2005)
	Brasil	Depósito da Usina	10	-	-	0.1 ^g	2.25 ^g	CCD	NI	NI	Castrillon e Purchio, (1988)
	Brasil	Área de Classificação	27	6.0	1.1	1.4	7.4	LCMS/MS	0.195	0.39	Pacheco e Scussel (2007b)
Sem casca	Brasil	Área de Classificação	30	2.5	ND	NA	NA	CCD	2.0	1.5	Pacheco (2003)
[B.2] Comércio Com casca	NI	Inglaterra	1	1-2	ND	NA	NA	CCD	5	NI	Kershaw (1985)
	NI	Reino Unido (Glasgow)	-	0-1	ND	NA	NA	CLAE	2	NI	Candlish et al. (2001)
	Brasil	Japão	4	0.2-1	14.5	NI	NI	HPTLC	0.6	NI	Tabata et al. (1993)
	Brasil	Suíça	1 ^m	8	-	1.88	79.8	CCD	0.5-2	NI	Steiner et al. (1992)
	NI	Suécia	17	0.1 a 1	-	0.01	2500	CLAE	0.01	NI	Thuvander et al. (2001)
Sem casca	Brasil	Manaus	27	02-05	1.1	1.4	7.4	LCMS/MS	0.195	0.390	Pacheco e Scussel (2007b)
	Brasil	Manaus	30	0.2-0.5	45.2	8.0	630	CCD	2.0	NI	Pacheco (2003)
	Brasil	África do Sul	51	20	21.0	8.3 ^g	20 ^g	HPTLC	0.1	NI	Ioannou-Kakouri et al. (1999)
	Brasil	Brasília	9	Mínimo 1	27.0	48	294	CCD	8	NI	Caldas et al. (2002)
	Brasil	Acre	-	-	ND	NA	NA	CCD	10	NI	Souza e Menezes (2004)
Brasil	Belém (PA)	22 ⁿ	-	-	-	66	21.679	CCD	0.2	1	Da Glória et al. (2006)

Brasil	Santa Catarina	63	-	ND	ND	ND	CCD	2	2	Scussel (2004)
Brasil	Belém (PA) ^o	4	0.5	ND	NA	NA	CLAE	-	NI	Freire e Offord (2002)
Brasil	Belém (PA) ^p			29.2	NI	NI				

^a não informado; ^b : Não Detectado; ^c:Comunidades de Itacoatiara/Autazes; ^d:Comunidades de Boca do Acre/Amaturá; ^e : Antes das BPM; ^f : Depois das BPM; ^g: AFL B1; ^h : Amostras da safra de 2007; ⁱ :Do total de 15 kg dividido em três grupos de acordo com o tamanho (grande, médio e pequeno); ^j : resultado de AFLB₁ para amostras do grupo de tamanho pequeno; ^k : País da beneficiadora que forneceu as amostras de castanha-do-Brasil para o estudo e não informada a origem; ^m : um lote de 42.286 kg; ⁿ : 22 amostras rejeitadas no estudo; ^o : Castanhas classificadas de Boa Qualidade; ^p : castanhas classificadas em Baixa Qualidade.

2.5.2 A problemática da castanha-do-Brasil, a União Européia e as ações por melhorias

As barreiras não-tarifárias impostas ao Brasil, em decorrência da contaminação por AFLs podem ter afetado as exportações para a União Européia, que estabeleceu diretrizes que envolvem toda a cadeia produtiva da castanha-do-Brasil, e passaram a exigir limites para AFLS, menores do que todos os demais países importadores.

Entretanto, levou ao surgimento de uma forte iniciativa brasileira de sua aplicação no desenvolvimento de produtos derivados e maior propaganda/divulgação de seu uso industrial como ingrediente, bem como conhecimento do valor nutricional da amêndoa por parte da população. Isto incentivou inclusive a busca pela melhoria da qualidade e por novos mercados.

O hábito de consumir de uma a três amêndoas por dia, mesmo que arbitrário, têm se tornado mais comum entre a população brasileira, antes preconizado e utilizado por países do primeiro mundo, principalmente na Europa, Ásia, EUA, Canadá e Japão. O consumo aumentou, principalmente por aqueles que além de função energética buscam suas propriedades antioxidantes, como agente anti-envelhecimento. Não somente como alimento, o uso do óleo da castanha pela indústria cosmética e de fitoterápicos tem crescido e propiciado a abertura de novos mercados. A aplicação da castanha-do-Brasil em dietas específicas tem sido ótima alternativa na nutrologia e na medicina ortomolecular (PACHECO; SCUSSEL, 2006)

Tanto as exigências de mercado, como de fiscalização pela segurança da castanha-do-Brasil, têm gerado uma forte tendência por melhorias na qualidade da cadeia produtiva, incluindo aspectos: estruturais, pessoais e de execução nos procedimentos de controles de processo (BRASIL, 2004). O trabalho de boas práticas de manejo desenvolvido em comunidades do Estado do Amazonas por Simões (2004), é um exemplo de que a melhoria da qualidade tem atingido desde as etapas iniciais da cadeia produtiva. O trabalho trouxe oportunidades de negócios aos extrativistas, com a mudança positiva da qualidade do produto antes e após o manejo correto (PEREIRA, 2002).

Quanto ao beneficiamento, a inovação tecnológica, apoiada por projetos governamentais (CAMPO/PAS, 2004), institucionais (CIRAD, 2007) ou pela iniciativa privada (NUTRICON, 2007) está ganhando espaço, demonstrando tanto ao homem da floresta como ao funcionário da usina, que os procedimentos corretos das boas práticas devem ser executados, visando à qualidade dos produtos. A aplicação dos mecanismos informatizados e de controle no processo que permitam a tomada de decisão imediata, principalmente nos processos de secagem gera informações fundamentais para o controle de qualidade. Essas inovações tecnológicas poderão permitir aos envolvidos no processo também estender os conceitos assimilados, ao seu cotidiano, contribuindo para uma melhor qualidade de vida, tão buscada em todas as políticas já estabelecidas para a castanha-do-Brasil.

O uso de novas tecnologias, como o descascamento automático, já utilizado em uma usina Boliviana demonstra que a competitividade da castanha brasileira deve estar voltada inclusive para outros países Amazônicos e não somente para países envolvidos com outros tipos de nozes. Essa melhoria da mão-de-obra e do processo como um todo, evidencia uma tendência natural de evolução do beneficiamento “artesanal” para o “inovador”, apesar de que, o Brasil ainda é o país com maior área de castanhais, e por sua vez, produtor da matéria-prima, utilizada pelas usinas bolivianas (PACHECO; SCUSSEL, 2006).

Devido à busca de qualidade, a abertura de novos mercados em países da Ásia, Austrália e o aumento do comércio interno, novas pesquisas quanto à agregação de valor à castanha-do-Brasil foram necessárias. Não somente a questão de contaminação está em destaque, mas principalmente a avaliação do real nível de AFLs em castanha-do-Brasil, fatores naturais anti-aflatoxigênicos (PACHECO; SCUSSEL, 2007) e qualidade dos produtos derivados (SOUZA; MENEZES, 2004).

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULKADAR, A. H. W.; AL-ALI, A.; AL-JEDAH, J. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. **Food Control**. v.11, p. 157-160, 2000.
- ADEBAJO, L.O; DIYAOLU, S.S. Mycology and spoilage of retail cashew nuts. **African J. of Biotechnology**, v.2, n.10, p.369-373, 2003.
- AMAZONAS, Governo do Estado. Agência de Florestas do Estado do Amazonas (AFLORAM). **Programa Castanha do Brasil - Cartilha do Coletor - Boas Práticas de Manejo**. Manaus, 21p. 2004.
- ANDRADE, E. H. A. et al. Seed Composition of Amazonian *Lecythidaceae* Species: Part 3 in the Series "Studies of Edible Amazonian Plants". **J. of Food Comp. and Analysis**, 12, p. 37-51, 1999.
- ALMEIDA, C. P. **Castanha do Pará - sua exportação e importância na economia Amazônica**. Estudos brasileiros. nº19. Rio de Janeiro/RJ: Serviço de Informação Agrícola, p.34, 1963.
- AMAZONAS, Governo do Estado. Cadeia produtiva da castanha-do-Brasil no estado do Amazonas. Manaus: SDS. **Série técnica meio ambiente e desenvolvimento sustentável**, 3. 28p. II, 2005.
- AMJAD I. S.; KHALIL, I; HAMIDULLAH, S. Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts, **Food Chemistry**, n. 98, p.699-703, 2006.
- ARRUS, K. et al. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **J. of Stor. Prod. Research**, v.41, p.513-527, 2005a.
- ARRUS, K., et al. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **J. Food Prot.** 68, p. 1060-1065, 2005b.
- ARAGÃO, F. J. L. et al. Expression of a methionine rich storage albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K *Lecythidaceae*) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* L., *Fabaceae*). **Gen. and Mol. Biology**, 223, p.445-449, 1999.
- AZIZ, N. H.; MOUSSA L. A.A. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. **Food Control**, 13, p.281-288. 2002.
- BARCLAY, M.N.I.; MCPHERSON, A.; DIXON, J. Selenium level of a range of UK foods. **J. of Food Comp. and Analysis**. 8, p.307-318,1995.
- BARTOLOME, B. et al. Allergens from Brazil nut: immunochemical characterization. **Allergol. Et Immunopathol.** v. 25, n.3, p.135-144, 1997.
- BAYMAN, P.; BAKER, J.; MAHONEY, N. *Aspergillus* on tree nuts, **Mycopathologia**. v. 155, p.161-169, 2002.
- BHATNAGAR, D. et al. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. **Mycopathologia**, 162, p.155-166, 2006.
- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Anim. Feed Sci. and Technology**, v.137, p.265-282, 2007.

BLESA, J. et al. Analysis of Aflatoxin in Peeled peanuts by liquid chromatography and fluorescence detection. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, 75, p.115-120, 2005.

BODÓ, E. T. et al. Preparation, homogeneity and stability studies of a candidate LRM for Se speciation. **Anal. Bioanal Chem.** 377, p. 32-38, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa - nº12, de 27 de Maio de 2004. Brasília/DF: **Diário Oficial da União**. Seção 1, 28 de Maio de 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeto de Monitoramento da Castanha do Brasil. Relatório de Atividades – 2002**. Brasília/DF: 2002. p.110.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Especificações para a padronização, classificação e comercialização interna da Castanha do Brasil**. Brasília/DF: v.08, nº19, Dez.1998.

BRASIL. Ministério do Interior. **Estudos e Pesquisas sobre a Castanha-do-Pará**. Belém/PA: SUDAM, p.97. 1976.

BRASIL. Decreto nº 51.209, de 18/08/1961. **Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização da exportação da “Castanha-do-Brasil”**. Brasília/DF: Diário Oficial de Brasília, p.853-855. 1961.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio. **A exploração da castanha do Pará**. Rio de Janeiro, 70p, 1929.

BONNELI, P. R. et al. Effect of pyrolysis temperature on composition, surface properties and thermal degradation rates of Brazil nut shells. **Bior. Technology**, 76, p. 15-22. 2001.

BRETT, G. M. Use indirect competitive ELISA for the detection of Brazil nut in food products. **Food control**, 15, p.65-69, 2004.

BRONZETTI, G. et al. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. **Mut. Research**. 496, p.105-115, 2001.

BULL, R.K.; SMITH, T.J.; PHIPPS, A.W. Unexpectedly high activity of ²²⁸Th in excretion samples following consumption of Brazil nuts. **Rad. Protec. Dosimetry**, v.121, n.04, p.425-428, 2006.

CALDAS, E. et al. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risk to human health. **Rev. de Saúde Pública**. v. 36, n.3. São Paulo: USP, p.319-323. 2002.

CAMARGO, I. P.; CASTRO, E.; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia e morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-Brasil. **CERNE**, v.6, n.2, p.011-018, 2000.

CAMPO/PAS, **Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da castanha do Brasil**. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos. Brasília, DF: Campo PAS, 2004.

CAMPOS, F. et al. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. **Fitoterapia**, 76, p. 26-29, 2005.

CANDLISH, A. et al. A survey of ethic foods for microbial quality and aflatoxin content. **Food Addit. and Contaminants**, v.18, n.2, p.129-136, 2001.

- CARTAXO, C. et al. Occurrence of aflatoxin and filamentous fungi contamination in Brazil-nuts left inside the forest. **Sem. Cient. Int. de Salud Animal**, Havana/CU: 2004. B56, Abstracts.
- CASTRILLON, A. L.; Purchio, A. Contaminating fungi producing aflatoxins in Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl 1808). **Acta Amazônica**, 18, p.173-183, 1988.
- CASTRILLON, A.L. **Ocorrência de aflatoxinas e de fungos produtores em castanha-do-Pará *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl., 1808**. Dissertação (Doutorado), USP, São Paulo, 1984.
- CAVALIERE, C. et al. Aflatoxin M1 determination in cheese by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, 1135, p.135-141, 2006.
- CAVALIERE, C. et al. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Chim. Acta**, n. 596, p.141-148, 2007a.
- CAVALIERE, C. et al. Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, 105, p.700-710, 2007b.
- CHANG, J. et al. Selenium content of Brazil nuts of two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, v.30, p. 801-802, 1995.
- CHATTA, S. A. S. et al. Antioxidant activity of different solvent extracts of rice bran at accelerated storage of sunflower oil. **J. of Food Lipids**, 13, p. 424-433, 2006.
- CHUN, H. S. et al. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. **Food Chemistry**, 102, p.385-391, 2007.
- CHUNHIENG, T. et al. Study of selenium in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. **J. of Agric. Food Chem.** **52**, p.4318-4322, 2004.
- CIRAD. The STDF safenut project. Oral presentation. 2007.
- CODEX ALIMENTARIUS. Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts. **CAC/RCP** 59-2005, Rev. 1-2006, 2006.
- COSTA, S. et al, Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v.41, p.483-488, 2006.
- COUTINHO, V.F.; BITTENCOURT, V.B.; COZZOLINO, S.M.F. Effects of supplementation with Brazil nuts (CP, *Bertholletia excelsa* H.B.K.) in capoeira players on selenium (Se) concentration and glutathione peroxidases activity (GSH-PX, E.C.1.11.1.9). In: **Trace Elem. in Man and Animal**. Springer ed., Part II, 2002.
- CRISHOLM, A., et al. Cholesterol lowering effects of nuts compared with a Canola oil enriched cereal of similar fat composition. **Nut., Met. & Card. Diseases**. v.15, p. 284-292, 2005.
- COZZOLINO, S. M. F. **Usos e aplicações das dietary reference intake. DRIs. ILSI BRASIL**. São Paulo/SP: Novembro, 2001.
- DA GLÓRIA, E. M. et al. Segregação da contaminação com aflatoxina durante a classificação das amêndoas de castanha-do-Brasil. In: V Congresso Latino-Americano Micotoxicologia, **p.155, 2006**.

DERNOVICS, M.; GIUSTI, P.; LOBINSKI, R. ICP-MS-assisted nanoHPLC-electrospray Q/time-of-flight MS/MS selenopeptide mapping in Brazil nuts. **J. of Anal. Atom. Spectrometry**, v. 22, p.41-50, 2007.

DE MELLO F. R.; SCUSSEL V. M. Characteristic of in-shell Brazil nuts and their relationship to aflatoxin contamination: criteria for sorting. **J. of Agric. Food Chem.** October. p. 9305-9310. 2007.

DIAZ-ALARCON, J.P. et al. Determination of selenium in meat products by hydride generation atomic absorption spectrometry—selenium levels in meat, organ meats and sausages in Spain. **J. Agric. Food Chem**, v.44, p.1494–1497, 1996.

DUKE, J. **Handbook of nuts**. Boca Raton: CRC Press. 343p. 1989.

DUMONT, E. et al. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack? **Food chemistry**, v.95, n. 4, p. 684-692, 2006.

EGAL A. S. et al. Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. **Int. J. of Food Microbiology**, v.104, p. 215-224, 2005.

ELLIS, W. O. et al. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. **Food Microbiology**, v.10, p. 9-21, 1993a.

ELLIS, W.O et al. Effect of inoculum level on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. **Food Microbiology**, v.10. p. 525-535, 1993b.

ELLIS, W.O. et al. Novel techniques for controlling the growth of and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in packaged peanuts. **Food Microbiology**, v.11, p.357-368, 1994.

EMBRAPA. **Castanha: Produtos Potenciais da Amazônia**, v.19, Brasília/DF: MMA, p.79, 1998.

EC- EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation 1525/98 of 16 July 1998, amending Regulation (EC) N. 194/97 of January 1997 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. **Official Journal of European Communities**, 1998.

EU- EUROPEAN UNION. Commission Decision of 4 July 2003, imposing special conditions on the import of Brazil nuts in shell originating in or consigned from Brazil (2003/493/EC). **Official Journal of the European Union**. 5.7.2003, L 168/33, 2003.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Amino acid content of foods and biological data on proteins**. Rome, FAO, p.62-63, 1970.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins 1995- A Compendium. **FAO Food and Nutrition Paper**, n.64, Rome, 1997.

FOSTER, L.H.; SUMAR, S. Selenium in health and disease: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, v. 37, p.211–228, 1997.

FRAGA, C. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molec. Asp. of Medicine**, v.26, p. 235-244, 2005.

FREIRE, F.; OFFORD, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. **Braz. J. Microbiol.** v. 33, n.2. São Paulo/SP: Apr/Jun, 2002.

FREIRE, F.C.O.; KOZAKIEWICZ, Z.; PATERSON, R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. **Mycopathologia**, n.149, p.13-19, 2000.

FREITAS, S. P. et al. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. **Cienc. Tecnol. Alimentos**, v.27, p.14-17, 2007.

FURR, K. A. et al. Elemental Composition of tree nuts. **Bull. Environm. Contam. Toxicol.**, v.21, p. 392-396, 1979.

GABAY, J.; SAX, J.J. Retention of Radium due to Ingestion of Brazil nuts. **Health Physics**. Pergamon Press, v.16, p.812-813, 1969.

GAMLI, O. F.; HAYOGLU, I. The effect of the different packaging and storage conditions on the quality of pistachio nut paste. **J. of Food Engineering**. v.78, p.443–448, 2007.

GEYIKOGLU, F.; TURKEZ, H. Protective effect of sodium selenite on genotoxicity to human whole blood cultures induced by aflatoxin B1. **Braz. Arch. of Biol. and Technology**. v. 48, n.6, p. 905-910, November, 2005.

GHARIEB, M. M.; GADD, G. M. Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal(loid) tolerance: vacuolar-lacking and –defective mutants of *Sacharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite. **Biomaterials**, v.11, p.101-106, 1998.

GILBERT, J.; ANKLAM, E. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 21, n.6-7, p. 468-486, 2002.

GLÓRIA, M.; REGITANO DARCE, M. Concentrado e isolado protéico de torta de Castanha do Pará: Obtenção e caracterização química e funcional. **Ciênc. e Tec. Alimentos**, v. 20, n.02. Campinas Maio/Ago, 2000.

GONZAGA, I. **Avaliação nutricional relativa ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, L).** 2002. 161 p.. Tese apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas para obtenção do grau de Doutor. São Paulo, 2002.

GONÇALVES, J. F. et al. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. **Braz. J. Plant Physiol**, v.14, n.2, p. 139-142, 2002.

GONZALEZ, E.; FELÍCIO, J.; PINTO, M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. **Braz. J. of Med. and Biol. Research**, v. 34, p.1453-1456, 2001.

GOWDA N.K.S. et al. Efficacy of heat treatment and sun drying of aflatoxin-contaminated feed for reducing the harmful biological effects in sheep. **Anim. Feed Sci. and Technology**, v.133, p. 167-175, 2007.

GUTIERREZ, E. M. R.; D'ARCE, M. A. B, Regitano; RAUENMIGUEL, A. M. O. Estabilidade Oxidativa do Óleo Bruto da castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*). **Cienc. e Tecnol. de Alimentos**, v. 17, n. 1, p. 22-27, 1997.

HALOUAT, A. E.; DEBEVERE, J.M. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. **Int. J. of Food Microbiology**, v.35, p.41-48, 1997.

HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of Selenium and its impact on food chain quality and human health. **J. of Trace Elem. in Med. and Biology**, v.18, p.309-318, 2005.

HIROMOTO, G. et al. Collective dose and risk assessment from Brazil nut consumption. **Rad. Prot. Dosimetry**, v.67, n.3, p.229-230, 1996.

HOLCAPEK, M. et al, Characterization of triacylglycerol and triacylglycerol composition of plants oils using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, v.1010, p.195-215, 2003.

HORN, B. W.; GREENE R. L.; Dorner J. W. Inhibition of Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus parasiticus* Using Non-aflatoxigenic Strains: Role of Vegetative Compatibility. **Biol. Control**, v.17, p.147-154, 2000.

KABAK, B.; DOBSON, A. D.W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Critic. Rev. in Food Sci. and Nutrition**, v.46, p.593-619, 2006.

KOUZES, R.T. et al, Naturally Occurring Radioactive Materials and Medical Isotopes at Border Crossings. **IEEE**. P. 1448-1452. 2004.

IARC. International Agency of Research on Cancer. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. In: **IARC Monographs**. Lyon, 56, p. 245-395. 1997.

IAMANAKA, B. et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. **Food Control**, 18, p.454-457, 2007.

IBGE. **Produção da Extração Vegetal e Silvicultura 2002**. [on line]. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 11/03/05. 2005.

IOANNOU-KAKOURI, E. et al. Surveillance and Control of Aflatoxins B1, B2, G1, G2 and M1 foodstuffs in the Republic of Cyprus:1992-1996. **Food and Chem. Contaminants**, v.82, n.04, p. 883-892, 1999.

IQBAL, S.; BHANGER, M.I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food chemistry**, 100, p.246-254, 2007.

JAYASHREE, T.; SUBRAMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Rad. Biol. & Medicine**, v.29, n.10, p.981-985, 2000.

JOLLY, P. et al. Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: Socio demographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices. **Int. J. Hyg. Environ.-Health** 209, p.345-358. 2006.

KABAK, D; DOBSON, A.D.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Crit. Rev. in food science and nutrition**. V.46, 596-619, 2006.

KAINER, K. et al. Liana loads and their association with *Bertholletia excelsa* fruit and nut production, diameter growth and crown attributes. **J. of Tropical Ecology**, 22, p.147-154, 2006.

KANNAMKUMARATH, S. S.; WUILLOUD R; CARUSO, J; Studies of various elements of nutritional and toxicological interest Associated with different molecular weight fractions in Brazil nuts. **J. of Agric. and Food Chem.** v. 52, p.5773-5780. 2004 a.

KANNAMKUMARATH, S. S., et al. Speciation of Arsenic in different types of nuts by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, 52, p.1458-1463, 2004 b.

KANNAMKUMARATH, S. S; WROBEL, K.; WUILLOUD, R. G. Studying the distribution pattern of selenium in nut proteins with information obtained from SEC-UV-ICP-MS and CE_ICP-MS. **Talanta**, 66, p.153-159, 2005.

KAUR, P.; BANSAL, M. P. Effect of selenium-induced oxidative stress on the cell kinetics in testis and reproductive ability of male mice. **Nutrition**, 21, p. 351-357, 2005.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. **Nature reviews**, v.3, p. 937-947, 2005.

KERSHAW, S. J. Aflatoxins in imported edible nuts: some data 1982-84. **J. of Food Technology**, 20, p. 647-649, 1985.

KLISCH, M. A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience**, 48, p.71-80, 2007.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolic in 10 different nut types. **Food Chemistry**, 98, p.381-387, 2006.

KOCYIGIT, A.; KOYLU, A.A.; KELES, H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. **Nut., Met. & Card. Diseases**, 16, p.202-209, 2006.

LEMIRE, M. et al. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. **Science of total environment**, 366, p.101-111, 2006.

LORINI, I. **Armazenagem de Grãos**. 1ªed. Campinas/SP: IBG, 2002. 1.000p.

LÓPEZ, C. et al. Determination of aflatoxins in nuts, peanuts, almonds and hazelnuts: identification of producing fungi. **Rev. Brás. de Toxicologia**, 13, p.51-54. 2000.

LEE, K.; JUN-HO, H. Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments, **Food Chemistry**, v.98, p. 71-75, 2006.

LEE S. et al. Inhibitory Effects of Naturally Occurring Compounds on Aflatoxin B1 Biotransformation, **J. Agric. Food Chem**, v.49, p. 5171-5177, 2001.

LETAVAYOVÁ, L.; VICKOVÁ, V.; BROZMANOVÁ J. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. **Toxicology**, 227, p.1-14, 2006.

MANJUSHA, R.; DASH, K.; KARUNASAGAR, D. UV-photolysis assisted digestion of food samples for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). **Food chemistry**, 105, p.206-265. 2007.

MARCELLINO, L. et al. Modified 2S albumins with improved tryptophan content are correctly expressed in transgenic tobacco plants. **FABS Letters**. v. 385, p.154-158.1996.

MARKLINDER, I. et al. Consumer's ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. **Food Addit. and Contaminants**, 22, p.56-64, 2005.

MARTINS, H.; MARTINS, M.; BERNARDO, F. Interaction of strains of non-toxicogenic *Aspergillus flavus* with *Aspergillus parasiticus* on aflatoxin production. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.37, nº6, 2000.

MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **Int. J. of Food Microbiology**, 107, p.180-185. 2006

MENESES, T. Castanha-do-Pará na Indústria de Alimentos. **Rev. Alim. e Bebidas**, v.4, p.42-43. 1968.

MENNINGER, E.A. **Edible nuts of the world**. The Brazil nut family. 174 p. 1977.

MISHRA, H.N.; DAS, C. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. **CRC Press LLC**. p. 245-263. 2007.

MOHAMED, R. et al. Quantitative determination of five ergot alkaloids in rye flour by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, 114, p.62-72. 2006.

MOLYNEUX, R. et al. Mycotoxins in edible tree nuts. **Int. J. of Microbiology**, In press. 2007.

MOODLEY, R.; KINDNESS, A.; JONNALAGADDA S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. **J. of Env. Sci. and Health**, 42, 585-591. 2007.

MOSS, M. O. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. **Int. Biod. & Biodegradation**, 50, p.37-142, 2002.

MORALES, H. et al. Patulin accumulation in apples during postharvest: Effect of controlled atmosphere storage and fungicide treatments. **Food Control**, 18, p. 1443-144, 2007.

MORALES, D.; FLORES, S. **Detección de la contaminación con aflatoxina B1 y G1 en las diferentes etapas de producción de la castaña (*Bertholletia excelsa*)**. In: II Congreso Latino Americano de Micotoxicología. Maracay, Venezuela, July 14-18, p.98,1997.

MORENO, F. J. et al. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). **Bioc. et Bioph. Acta (BBA). Proteins & Proteomics**, 1698, p.175-186, 2004.

MORI, S. A.; PRANCE G.T. Taxonomy, Ecology, and Economic Botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.: *Lecythidaceae*). **Adv. Econ. Bot**, 8, p.130-50, 1990.

MULLER, C. H. **Castanha-do-Brasil, estudos agronômicos**. Belém: EMBRAPA. CPATU, 25p, (Documento1). 1981.

MURTAGH, G.J. et al. *In vitro* stability and immunoreactivity of the native and recombinant plant food 2Salbumins Ber e 1 and SFA-8. **Clin. Exp. Allergy**, 33, p.1147-1152, 2003.

NAGASHIRO, C.W. et al. Chemical composition, digestibility and aflatoxin content of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) cake produced in North-eastern Bolívia. **Livest. Res. for Rural development**, 13, 2001.

NAS - National Academy of Sciences (US), 2000. In: Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. In: <http://www.nap.edu/catalog/9810.html>. Acesso em 23/04/07.

NRI - Natural Resources Institute. **Manual of mycotoxins training**. Londres, UK, 1983.

NORDLEE, J. et al. Identification of a Brazil-Nut allergen in transgenic soybeans. **The New England Journal of Medicine**, 14, p. 688-692. 1996.

NORMEN, L. et al. A phytosterol database: fatty foods consumed in Sweden and the Netherlands. **J. of Food Comp. and Analysis**, 20, p. 193-201, 2007.

NUTRICON. **Cartilha de Higiene para manipuladores de alimentos**. 15 p. 2007.

NYBG- The New York Botanical Garden. **The Brazil nut Industry- Past, present and the future**. Disponível em: <http://www.nybg.org/bsci/braznut/>. Acesso em 09/05/2006. 2006.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Eastern and Western Amazon basin. **J. Agric. Food Chemistry**. In press. 2007a.

PACHECO, A.; SCUSSEL, V. M. **Castanha-do-Brasil: da floresta tropical ao consumidor**. Florianópolis: Editograf, 171 p. 2006.

PACHECO, A. M. **Ocorrência de aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) na análise de perigos e pontos críticos de controle em três etapas da cadeia produtiva da Castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa H.B.K.) na safra de 2002**. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Manaus/AM: Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Amazonas, 87p. 2003.

PALMER, I. S.; HERR, A.; NELSON, T. Toxicity of selenium in Brazil Nuts to rats. **J. of food Science**, 47, p.1595-1597, 1982.

PAPPA, E.; PAPPAS, E.; EUTHANASIOS, C; SURAI, P. Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. **Sci. of the Total Environment**, 372, p.100-108. 2006.

PASONE, M. A.; RESNIK, S.; ETCHEVERRY, M. G., Antiaflatoxic property of food grade antioxidants under different conditions of water activity in peanut grains, **Int. J. of Food Microbiology**, 118, p.8-14, 2007.

PATERSON, R. M. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR, **Proc. Biochemistry**, 41, p.1467–1474, 2006.

PEARSON, S.M. et al. Determination of aflatoxin levels in pistachio and cashew nuts using immunoaffinity column clean-up with HPLC and fluorescence detection. **Biotec. Techniques**, 13, p.97-99, 1999.

PECHNICK, E; BORGES, P.; SIQUEIRA, R. Estudo sobre a Castanha-do-Pará. **Arq. Bras. de Nutrição**, v.7, p.7-42, 1950.

PELUS, E. et al. Trace element (Cu, Zn, Fe, Mn, Se) intakes of a group of French men using the duplicate diet technique. **Int. J. Food Sci. Nutr**, 45, p.175-179, 1994.

PENEDO, P.; COELHO, G. L. Purificação de óleos vegetais por extração com CO₂ supercrítico. **Cienc. Tecnol. Alimentos**, v. 17, 1997.

PEREIRA, H. S. **Controle da contaminação por aflatoxinas na cadeia produtiva de Castanha do Brasil - Relatório Técnico de Projeto**. Manaus/AM: CNPQ, 2004, 42p.

PERES, C. et al. Demographic threats to the sustainability of Brazil Nut exploitation. **Science**. v. 302. p.2112-2114, 2003.

PHILIPS, K.; RUGGIO, D. M.; ASHRAF-KHORASSANI, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. **J. Agric. Food Chem**, 53, p.9436-9445. 2005.

PINHEIRO M. C. N. et al, Mercury and selenium concentrations in hair samples of women in fertile age from Amazon riverside communities. **Sci. of the Total Environment**, 349, p. 284-288, 2005.

PRADO-FILHO, L.G. Umidade relativa de equilíbrio e oxidação de lipídios em farinhas de castanha-do-pará, de macadâmia e de soja. **Sci. Agrícola**, 51, p.357-362, 1994.

RASTOGI, S. et al. Skin tumorigenic potential of aflatoxin B1 in mice. **Food and Chem. Toxicology**, 44, p.670-677, 2006.

REID, M. E. et al. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. **J. of Trace Elem. in Med. and Biology**, 18, p.69-74, 2004.

REN, Y. et al. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, 1143, p. 48-64, 2007.

REILLY, C. 2006. **Selenium in Food and Health**. Springer: United States of America, 2. ed. p. 158-172, 2006.

RIBEIRO, M.A.A.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; LIMA, U.A. Whole and shelled Brazil nut storage: effect of the temperature on their resistance to rancidity. **Sci. agric**. v. 50, p.343-348, 1993.

RITTER, M.M.C.; SAVAGE, G.P. Soluble and insoluble oxalate content of nuts. **J. of Food Comp. and Analysis**, 20, p.169-174, 2007.

RODRIGUES, C. et al. Deacidification of Brazil nut and Macadamia Nut oils by solvent extraction: Liquid-Liquid Equilibrium Data at 298.2K. **J. Chem. Eng Data**, 50, p. 517-523. 2005.

RODRIGUES, J. E. et al. Phase equilibrium measurements of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) oil in supercritical carbon dioxide. **J. of Sup. Fluids**, 34, p.223-229. 2005.

- ROJAS-DURAN, T R. et al. Study of a room temperature phosphorescence phenomenon to allow the detection of aflatoxigenic strains in culture media, **Int. J. of Food Microbiology**, 115, p.149-158, 2007.
- RUNDBERGET, T.; WILKINS, A. L. Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, 964, p.189-197, 2002.
- RYAN, E. et al. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. **Int. J. of Food Sci. and Nutrition**, 57, p.219-228, 2006.
- SAKUDA, S. et al. Aflastatin A₁, a novel inhibitor of aflatoxin Production of *Aspergillus parasiticus* from *Streptomyces*. In: **J. Am. Chem. Soc.** v.118, p.7855-7856, 1996.
- SANTOS, C.; ALVES, P.; VALE, V. Controle da produção de aflatoxina em amendoim pelo uso de plantas medicinais contendo mentol. In: **XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, Livro de Resumos. Fortaleza/CE: SBCTA, v.3, p.10-15, 2000.
- SAPSFORD, K. et al. Rapid detection of foodborne contaminants using an Array Biosensor. **Sensors and Actuators B**, 113, p.599–607, 2006
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis/SC: Editora Insular, 1998.
- SECOR, C.L.; Lisk, D.J. Variation in the selenium content of individual Brazil nuts. **J. of Food Safety**, 9, 279-281, 1989.
- SEIFRIED, H. E. et al. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **J. of Nut. Biochemistry**, 18, p.567–579, 2007.
- SIBANDA, L.; MAROVATSANGA, L. T.; PESTKA, J. J. Review of mycotoxin work in sub-Saharan Africa. **Food Control**. n. 8, p.21-29. 1997.
- SILVA, F.A.; MARSAIOLI, A. Jr., Atividade de água em amêndoas de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) secas por microondas e convencionalmente. **Rev. Cienc. Exatas e Naturais**, vol. 5, n.1, 2003.
- SIMÕES, A. V. **Impactos de tecnologias alternativas e do manejo da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*, Humb. & Bonpl., 1808) no controle da contaminação por aflatoxinas em sua cadeia produtiva**. Dissertação (mestrado em Ciências Agrárias). Manaus/AM: Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, 62p. 2004.
- SIMSEK, O.; ARICI, M.; DEMIR, C. Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*. In: **Nahrung/Food**. v. 46, nº3, p.194-196, 2002.
- SINER, M.; PULS, J.; DIETRICH, H. Carbohydrate composition of nut shells and some other agricultural residues. **Starch**, 31, p.267-269, 1979.
- SOLIS, V. E.S. **Modificações no óleo da castanha do Pará**. Tese (Doutorado em tecnologia de alimentos). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 105p.
- SOUZA, J. et al. Hongos filamentosos associados a la almendra de castana-de-Brasil en Unidades de Procesamiento en el Estado de Acre. **Sem. Cient. Int. de Salud Animal**, Havana: 2004, B56, Abstracts.

SOUZA, M. L; MENEZES, H. C. **Processamento de amêndoa e torta de Castanha do Brasil e Farinha de Mandioca: parâmetros de qualidade - Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas/SP: v. 24, nº01, 2004.

SOUZA, M. L. **Processamento de cereais matinais extrusados de castanha-do-Brasil com mandioca**. Tese. (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Campinas/SP: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2003. 191p.

SOUZA, M. L. et al. Caracterização microbiológica de amêndoa torrada e salgada. **Ciê. Agron.**, 18, p. 161-166, 1987.

STEINER, W.E. et al, Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and Pistachio nuts. **J. of Agric. and Food Chem.** 40, p.2453-2457, 1992.

SUHR, K. I.; NIELSEN P. V. Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. **J. of Food Science**, v.70, n.1, 2005.

SUN, S.; LEUNG, F; TOMIC, J. Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) Proteins: Fractionation, Composition and Identification of a sulfur-rich protein. **J. Agric. Food Chem.** v.35, p.232-235. 1987.

TABATA, S. et al. Aflatoxin Contamination in Foods and Foodstuffs in Tokyo:1986-1990. **J. of AOAC International**. v. 76, n.1, p. 32-355,1993.

TANIWAKI, M. H. et al. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. **Int. J. of Food Microbiology**, 68, p. 125–133. 2001.

THUVANDER, A. et al. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. **Food Addit. and Contaminants**. v.18, n.8, p.696-706. 2001.

TOPFER, A. et al. Determination of ochratoxin A in beer by LC-MS/MS ion trap detection. **Food Chemistry**, 100, p.312-317. 2007.

TURNER, R.C.; RADLEY, J. M.; MAYNEORD, V. W. The naturally occurring alpha activity of foods. **Health Physics**, 1, p.268-275,1958.

TUPIASSU, A; OLIVEIRA, N; **A. Castanha do Pará - Cadernos Paraenses**. Belém/PA:IDESP,1967.

UDEN, P.C., et al. Selective detection and identification of Se containing compounds- review and recent developments. **J. of Chromatography A**, 1050, p.85-93. 2004.

USDA, 2003. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2003. USDA Nat. Nutr. Database for Standard Reference, Release 16. Nutr. Database Lab. Home Page, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.

UYSSAL, H; AGAR, G. Selenium protective activity against Aflatoxin B₁, adverse effects on *Drosophylla melanogaster*. **Braz. Arch. of Biol. and Techn.**, v. 48, n.02, p. 227-233. 2005.

VALKO, M. et al Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, 160, p.1-40, 2006.

- VERSILOVSKIS, A.; BARTKEVICS, V.; MIKELSONE, V. Analytical method for the determination of sterigmatocystin in grains using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray positive ionization. **J. of Chromatography A**, 1157, p. 467-471, 2007.
- VENKATACHALAM, M.; SATHE, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **J. of Agric. Food Chem.** v. 54, p.4705-4714, 2006.
- VIERA, T.M.F.S.; REGITANO-DARCE, M.A.B. Antioxidant concentration effect on stability of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) crude oil. **Arch. Latin. de Nutricion**, 49:271-274. 1999.
- VONDERHEIDE, A. et al. Characterization of Selenium species in Brazil Nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, p.5722-5728, 2002.
- XAVIER, J.J.M.; SCUSSEL, V. M. Development of methodology by LC MS/MS for aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in Brazil nuts for export. **Int. J. of Environ. Chem.** In press.
- XIULAN, S. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B1 in foods. **Food Control** 17, p. 256-262, 2006.
- WATSON, D.G.; ATSRIKU. C.; OLIVEIRA, E.J. et al. Review role of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of oxidation products and antioxidants in biological systems. **Anal. Chim. Acta**, 492, p.17-47, 2003.
- WHITAKER, T. Standardization of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. **Food Control**, 14, p. 233-237, 2003.
- WILPLINGER, M; SIMA A. Pfannhauser W. Selenghalt in der Nahrung und dessen Zusammenhang zum Gehalt im Booden. **Lebensmittelchemie** 52, p.92-95, 1998.
- WILD, C. et al. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. In: **BMJ**. v.325, p.29-30, 2002.
- YABE, K; NAKAJIMA, H. Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, 64, p. 745-755, 2004.
- YU, J. et al. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. **Appl. and Environ. Microbiology**, p.1253-1262, 2004.
- ZOHRI, A.A.; SABER, S.M.; MOSTAFA, E. Effect of selenite and tellurite on the morphological growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus* var. *globosus* IMI120920. **Mycopathologia** 139, p. 51-57, 1997.
- ZOLLNER, P.; MAYER-HELM B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **J. of Chromatography A**, 1136, p. 123-169, 2006.

3. ARTIGO

SELENIUM AND AFLATOXIN LEVELS IN RAW BRAZIL NUTS FROM THE EASTERN AND WESTERN AMAZON BASIN

**Trabalho aceito e em processo de publicação na revista: Journal of Agricultural and
Food Chemistry**

Selenium and Aflatoxin Levels in Raw Brazil Nuts from the Amazon Basin

3.1 ABSTRACT

Whereas selenium (Se) is an important antioxidant in human metabolism to prevent cancer, aflatoxins are highly carcinogenic. Brazil nuts from Eastern and Western Amazon regions were evaluated to find any relationship between Se and aflatoxins levels. Eighty (in-shell and shelled) nuts samples were collected directly from different forest sites and analyzed for Se by atomic emission spectrometry and aflatoxins by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The LOQ for Se was 2.0 mg/kg and for total aflatoxins 0.390 $\mu\text{g/kg}$. Nut Se levels from the Eastern region were higher than the Western and also the aflatoxins. The raw nuts moisture content (mc) and water activity (a_w) from the two regions did not present significant difference, either for *in-shell* or *shelled*. Mc was 24.5 (min. 20.1; max. 30.4) and 22.1% (min. 14.6; max. 28.9) and a_w of 0.85 for both regions. Further studies need to be carried out to find out the role of Se on fungi growth stress and aflatoxin production mechanisms.

Key Words: aflatoxins, selenium, LC-MS/MS, Brazil nuts, Amazon basin, moisture content, tandem liquid chromatography

3.2 INTRODUCTION

Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) are one of the most important nutritional examples of food with high content and quality protein. They have high levels of essential amino acids, including the sulfur containing: methionine and cysteine (1-2). In addition, Brazil nuts are more rich in selenium (Se) than other nuts (3- 5). Se plays an important role as an antioxidant, and also is involved in thyroid metabolism and cancer prevention. It was shown that the inclusion of Brazil nuts in the diets of rats, that received intragastric administration of the mammary carcinogen dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), reduced the number of tumors by up to 72.7% (6). As Se has been reported as an important micronutrient and Brazil nuts are a source, there has been an increasing interest by consumers in that commodity (7-9). Brazil nuts have been recommended to be consumed, either as it is or as an ingredient in processed food. As Se has been considered an excellent antioxidant, it has been recommended as anti-aging and is consumed by athletes, the elderly and those that desire for a healthy life (8). The Se daily intake (DI) varies among different countries from 6 (New Zealand) to 224 µg/day (Canada) (10-11). For European countries the Se DI have been reported from 32.3 to 70 µg /day (12). The Se recommended dietary allowance (RDA) was established by the National Research Council in 2000 as 55 µg/day and the tolerable upper intake level (TUL) for adults set at 400 µg/day (13).

Brazil nuts may vary in size, shape and flavor when grown in different areas of the Amazon basin (Gribel personal communication), despite the time of harvest thus their composition may also vary. Most of them grow in areas surrounded by rivers and some far from them, in drier soil. The Amazon basin is divided into Western and Eastern regions (14) and both have the Amazon River and its tributaries intersecting them. Some studies on Se levels in Brazil nuts have been carried out (1, 4, 7, 8, 15-17) and one correlated Se with the tree nuts growing areas (16). The authors reported different Se levels in nuts from two areas divided for that study into West (States of Acre and Rondônia only) and Central (States of Amazonas and Para). They collected processed nut samples in the retail market and reported Se levels of 3.06 and 36.0 mg/kg for each region, respectively, in individual nuts. However, the commercial snack products are prepared by the factories utilizing raw nuts from different Amazon sites and it is difficult to determine their exact origin.

On the other hand, some aflatoxins and fungi have been detected in processed in-shell Brazil nuts (18-26). In fact these toxins are produced by *Aspergillus flavus*, that finds good conditions for its proliferation in the Amazon forest, with high temperatures: > 25 °C and relative humidity (RH): > 80% (23, 25). The fungus species may grow on nuts during the extractive activities that are carried out under artisan conditions in the indigenous communities (23). It also can grow during the raw nut transport, done mostly by boats, to the factory site, where they are going to be processed and have their moisture content reduced (25-26).

Despite the decrease of Brazil nuts export to the European Union (EU), due to a more restricted regulation of aflatoxin levels, the nut antioxidant properties have increased the consumer interest. Whereas Se is an important antioxidant in human metabolism to prevent cancer, aflatoxins are highly carcinogenic. The Se concentration in individual nuts varies greatly ranging from 0.20 to 253 mg/kg (4) depending on the soil composition and tree absorption. The aflatoxin association with Se in Brazil nut has not been studied, neither related to the different Amazon regions. Therefore, this study was carried out in order to evaluate the Se content, the possible presence of aflatoxin and any correlation between them in raw Brazil nuts using atomic spectrometry and tandem mass spectrometry. The study compared the raw Brazil nuts from the Western and Eastern regions of the Brazilian Amazon basin.

3.3 MATERIAL AND METHODS

Material

Samples. raw, medium size, in-shell Brazil nuts, year 2006 harvest, from the Eastern (oriental) and Western (occidental) regions of the Brazilian Amazon basin. We utilized and referred for this study to the official geographic location of the two main Amazon regions as follows: Eastern Amazon region comprises the states of Para, Amapa, Northern part of Maranhao and the Eastern part of State of Amazonas (starting from Manaus city to the East); Western Amazon region comprises the states of Acre, Rondônia, Roraima and the Western part of State of Amazonas (starting from Manaus city to the West). **Figure 1 A** shows details of the whole Amazon basin with the Brazil nut trees distribution and the Northern Brazilian states with the location of the cities of sample collection.

Chemicals. ammonium acetate, ammonium sulfate, hydrochloric acid, nitric acid and anhydrous sodium sulfate (Analar grade), Vetec, Rio de Janeiro, Brazil; methanol, acetonitrile, benzene (HPLC grade), Carlo Erba, Rodano Italy. Ultrapure water (MilliQ system), Millipore. Selenium standard: from NIST (certificate N° SRM 3149) as sodium selenite (Na_2SeO_3) acidified aqueous solution prepared with nitric acid). Aflatoxin standards: AFB₁, AFB₂, FG₁ and AFG₂, from Sigma, Germany.

Apparatus and equipments: for Se analysis - spectrophotometer, Hitachi and atomic emission spectrophotometer (inductively coupled plasma-ICP), Otima 2000, Perkin Elmer, Toronto, Canada. For aflatoxin analysis - liquid chromatograph (LC) 1100, Agilent and mass/mass detector (MS/MS) API 4000 triple-quadrupole (Applied Biosystems) equipped with either APCI or ESI interface; ZORBAX C₈ column (4.5 x 150 mm, 5 µm particle size), Hicrom. *Other materials:* disk mill, Metvisa, São Paulo, Brazil; commercial Brazil nut-crackers, CIEX, Manaus, Brazil. A_w: Pawkit, Decagon.

Methods

Sampling: 80 samples were collected (April to May) from two cities that represent the main extractive communities of each Amazon region. Western region: cities of Amaturá and Boca-do-Acre. Eastern region: cities of Itacoatiara and Autazes (Figure 1 B). These are converging points to which the nuts collected in the forest around that location are gathered and also where nuts are stored (second storage) prior to boat loading to be transferred to the factories for processing. The sampling method used was that required by the EU (27). The samples were representatively collected from silos (capacity of 400-800 kg) of each city, weekly, homogenized in bags and final portions of 30 kg taken, packed and immediately sent to the laboratory. These amounts were divided into two portions of in-shell and shelled nuts for Se and aflatoxins analysis (considered to be representative for <0.1 tonne). *Sample preparation:* from the two portions of in-shell nuts, one was de-shelled using a special commercial Brazil nut-cracker. The samples, still frozen, were finely ground (particle size <100 µm) in the disk mill, homogenized and portions of 500 g were transferred to polyethylene containers with stoppers and stored in a freezer. Portions of 50 and 25 g were used for Se and aflatoxin analysis, in duplicate.

Selenium analysis. ICP- Optical emission spectrometry (OES), using atomic emission method (28). The digestion of the samples (0.4g) was carried out using 5 mL of

concentrated HNO_3 . The limit of detection (LOD) was 2.00 mg/kg and the limit of quantification (LOQ) was 3.50 mg/kg. LOQ was defined as the lowest point of the calibration curve with high repeatability- axial view. The recovery was 92 % (n=3).

Aflatoxins analysis. LC-MS/MS with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) in the positive mode (29). LC conditions (C_8 column): mobile phase methanol:water gradient [45% water : 55% methanol (3 min); from 3 to 5 min the gradient was changed to 30 % water : 70% methanol] and flow rate of 1 mL/min. MS/MS: parent and the two daughter ions (m/z) were selected for each toxin as follows: AFB_1 : 313.1 m/z (241.10 and 285.10); AFB_2 : 315 m/z (259.09 and 287.20); AFG_1 : 329.1 m/z (200.05 and 243.05); and AFG_2 : 331.2 m/z (245.07 and 231.20). The LOD and LOQ for LC-MS/MS of AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2 were: 0.04, 0.045, 0.05 and 0.06 $\mu\text{g/kg}$ and 0.08, 0.09, 0.1 and 0.12 $\mu\text{g/kg}$ for each aflatoxin, respectively. The LOD and LOQ for total aflatoxin were: 0.195 and 0.390 $\mu\text{g/kg}$. To obtain those parameters the finely ground Brazil nuts were homogenized, and spiked, prior extraction with aflatoxins at five concentrations ranging from 1 to 10 $\mu\text{g/kg}$. Portions of 25 g were taken for extraction adding 100 mL acetonitrile/water (80:20 v/v) to the sample, mixed for 2 h, and filtered. The LOD method was defined by 3 times the signal/noise ratio and LOQ by 6 times the signal/noise. Five points were used to build an analytical curve, in order to obtain the R values for LOD and LOQ. Each point corresponded to a mean of five injections of each extract. The Recoveries for each aflatoxin (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2) were: 92.4; 72.5; 99.8 and 97.1%, respectively. The shell/nut ratio utilized for calculation was that reported by de Mello and Scussel (30) of 60/40 (60% shell/40% nut) with the factor 1.5, considered the standard ratio for normal healthy whole Brazil nuts.

Moisture content (mc): by gravimetric method (31).

Water Activity (a_w): water activity kit (Pawkit) and calibration salt slush (31).

Statistical analysis: analysis of variance (ANOVA).

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

The data obtained on the Se and aflatoxins levels in the raw Brazil nuts collected from the Eastern and Western regions of the Amazon basin, as well as mc and a_w , are summarized in **Table 1**. Differences in the Se and aflatoxin levels were observed both, from the two regions and nut type (in-shell or shelled).

Selenium levels in Raw Brazil nuts

Se in the raw nuts from Eastern and Western Amazon Regions: the Se levels detected in all nuts samples surveyed, from both regions, ranged from 8.5 to 69.7 mg/kg (RSD% 11.2). However, they had a clear difference with respect to the Amazon region where the nuts came from. The Western region, either the shelled or in-shell nuts samples, presented lower Se levels than the Eastern region nuts. The mean Se levels of shelled nuts were 23.6 and 43.8 mg/kg, respectively for both regions. Similarly for the in-shell nuts, it was 12.7 and 24.8 mg/kg, respectively. The Se levels were ca. 2 fold lower in the nuts from Western than Eastern region, respectively. The Se difference among the two nut types was probably due to the shell being included to the analytical sample portion of the in-shell nuts for Se analysis thus diluting it. From our data, the shell might have less Se than the edible part as the results were lower than shelled nuts. We did not analyze the shell. Data in the literature for in-shell and shelled nut Se levels, report that in-shell nuts have more Se than shelled (15-17). However, that is not because the authors analyzed the Se in the shell and in the edible part separately, but due to their snack packs label information on the type and product origin (i.e., nuts commercialized shelled are from the West and when commercialized in-shell are from the East). On the other hand, when Vonderheide et al. (17) analyzed the shell they found very small amounts (2µg/g). No significant difference was observed for the Se levels of nuts collected in the two cities, the nut converging points from the same Amazon region. Either Boca do Acre and Amaturá (Eastern Amazon) or Itacoatiara and Autazes cities (Western Amazon) presented similar Se levels of 12.7/23.6 or 24.8/43.8 mg/kg (in-shell/shelled), for each region, respectively. Considering that the Se levels detected in the nuts are a consequence of its absorption by the Brazil nut trees from the soil that could be the reason why the individual nut batches that came from the several extractive communities surrounding each city and from the same region, had similar levels. As far as the Se levels reported in the literature for Brazil nuts are concerned (1-5, 15-17), they vary quite widely, especially the data reported by Chang et al. (16), by a fluorometric method. These authors reported Se levels, utilizing a range from 0.02 to 512 µg/g being 0.03-31.7 and 1.25-512 mg/kg for a West and Central areas divided for that study purpose. Despite the levels detected, the Amazon regions that were indirectly derived from the information obtained from the packing label, cannot indicate the real precedence of the nuts. Usually the factories that produce those snack packs receive

the nuts already dried from wholesale factories. Those factories in turn receive the raw nuts from several extractive areas for processing. Thus the nuts analyzed by the authors may come also from the Amazonas state which is included in the official Western region.

Se in the Amazon basin soil: The Se distribution in Brazil nut is dependent on the tree absorption ability according to factors, such as: the soil Se concentration; the chemical Se form in different Amazonian soil (acid or alkaline rivers); presence of heavy metal (Hg, mining); rain intensity and the genetic characteristics of the plant on metabolizing the Se absorbed from the soil (32) and also the forms that Se is present in the nut (Selenomethionine and Selenocysteine) (17). It has been reported that the soil of the Eastern Amazon region is rich in Se with concentrations ranging from 5.2 to 9.4 mg/kg which are much higher than the Western region (1.0 to 2.4 mg/kg) (33). In fact, the soil Se concentrations of Itacoatiara and Autazes cities which are located in the Eastern region are higher with 9.4 and 8.1 mg/kg, respectively. On the other hand, soils of Boca do Acre and Amaturá (Western region) are lower in Se with 2.4 and 1.2 mg/kg (33). Therefore the Se in the nuts of the two regions may also vary in proportion to those soil compositions. FAO in 1993 reported that the reason that Brazil nut concentrates Se is probably due to the fact that Se is very similar chemically to sulfur, an essential nutrient for the nut seed amino acids (Methionine and Cysteine) and protein formation. Sulfur is often deficient in Amazon soils, especially after decades of Brazil nut harvesting and export. If the soil contains significant amounts of Se, it may be used by the plant instead of sulfur (34).

Se RDA per Brazil nut: Considering the current data obtained, Brazil nuts can reach high levels of Se, its daily intake needs to be evaluated. Although Se has and can be used due its anticancer activity, and it element has been recommended to be used as cancer-preventive, however Se doses must be tested to establish its safety for long term high-dose supplementation using organic Se compounds (35-36). A Se safe dose is that amount that is considered enough to supply the needs and does not cause any toxicological effects. That intake can be achieved naturally in the diet, by ingestion of different types of nuts that are rich in Se, including the Brazil nuts. As its concentration in Brazil nuts, from our data, depends on the extractive regions where they are from, it is important to follow the recommended Se RDA of 55 µg/day or at the most TUL of 400 µg/day (13). The Eastern Region had Se levels higher (20.7-69.7 µg/g) than the

Western (8.5- 35.1 mg/kg). That concentration would lead to an amount of Se in an individual edible nut (medium size, shelled, 3.8 g edible) of 78.6-264.8 mg/kg and 32.3-133.3 mg/kg for nuts from Eastern and Western regions, respectively. Regarding the amounts of nut to be consumed in order to accomplish the RDA or TUL, a person should ingest one nut/day. From the data obtained in this study it seems that the nuts with the Western Se level would supply the RDA and the Eastern both RDA and TUL.

Toxicity and Se stress: as far as Se toxicity is concerned, it has been reported that high Se levels can be either cytotoxic or possibly carcinogenic. The cytotoxic effect has been suggested to be associated to oxidative stress (36). Therefore, supra-nutritional doses, as presented in some Brazil nuts, could be considered a warning factor if the consumption per day exceeds the dietary doses especially in a long term consumption. The Brazil nuts that have high Se levels could be used by to the food industries as ingredients, in small quantities, in several products. A work carried out by Lima et al reported that high levels of Se were detected from fish of an Amazon region area studied (37). The authors reported the reason being the environmental exposure to high Se levels in the soil and plants. On the other hand, studies with *Drosophila melanogaster* have suggested that Se could inhibit aflatoxin B₁ and its toxic effects (38). In preliminary experiment to evaluate the Selenium toxicity of a Brazil nut meal in rats, was evident the Selenium action, extremely dependent of the doses (9 mg/kg against 300 mg/kg) to affect as nutritional element to increase weight or to be toxic to cause damage (39). Although, in other study, it was evident that *flavus* growth was increasingly inhibited as the concentrations of selenate in the culture solution increased, suggesting the influence of some Selenium form in the fungal metabolism (40).

Aflatoxin levels in raw Brazil nuts from Eastern and Western Amazon basin

Although the aflatoxin levels detected were not very excessive in the raw Brazil nuts, they were present in some samples and varied with the nut type and region from where they were collected.

Raw in-shell Brazil nuts and aflatoxin. As the LC-MS/MS method is very sensitive, able to detect aflatoxins at ppt levels, they were found in 29 and 26 nuts samples from each region respectively. Levels of total aflatoxins ranged from 1.2-11.5 µg/kg. The Eastern region samples contained more numbers of samples and levels of aflatoxins

(2.0-11.5 µg/kg) than the Western (1.2-4.5 µg/kg). Although those nuts samples showed some aflatoxins, most of the levels were lower than limit established by the EU of 4.0 µg/kg for total aflatoxins, a more restrictive international regulation. Only one (4.5%) and 12 (14.6%) nut samples from Western and Eastern regions contained levels higher than that regulation. No Brazil nut surveyed presented levels higher than the Canada, Mercosur or USA limit (15, 20 and 20 µg/kg) (41, 42). The aflatoxin B₁ levels found in the in-shell nut samples (1.22-1.40 µg/kg) were lower than the EU limit of 2.0 µg/kg in all samples. As far as raw Brazil nuts and aflatoxins levels reported in the literature are concerned, there are only two studies using nuts at that stage, and they are mainly on fungi infestation and their toxigenic strains. Arrus et al (24) carried out some analysis on raw nuts taken from the pods collected when they were still on the trees. They isolated *A. flavus* strains but no aflatoxins were detected and the methodology used was ELISA with an LOD of 1.75 µg/kg total aflatoxins. Our data was obtained using a more sensitive methodology (LOQ of 0.39 µg/kg) which can give a better view of aflatoxin presence in the nuts, but it is important to emphasize that the data obtained were from an intermediary stage of the Brazil nut chain (i.e., after pods/nuts collection from the forest transferred to the cities and before the boat transport to the factories). These raw nuts after transport to the factories are going to be submitted to the drying process and part of those aflatoxin levels may be reduced. That reduction could happen during the two sorting steps: prior drying in heaters and after they pass through a conveyor, where the spoiled/cracked and moldy nut will be discarded (31). Concerning transport by ship abroad some containers have monitoring/controlling of systems for RH and temperature. Containers without those systems may provide favorable conditions to fungal growth.

Raw shelled Brazil nuts and aflatoxin. When nuts are processed shelled, apart from the rotary heating step, they still pass through a steam vapor step with temperature reaching 105° C for 5-15 seconds (to facilitate shell removal) apart from two sorting steps, at de-shelling and classification tables, thus discarding the spoiled nuts prior to vacuum packing. As far as aflatoxin in shelled nuts are concerned, although the raw shelled nut samples were prepared from the same main nut composite samples used for in-shell, it was observed that 6 nut samples from the Eastern region ones presented

slightly higher levels (1.7-11.9 µg/kg) i.e., above the EU regulation and none higher than the Canada, Mercosur or USA limit (15, 20 and 20 µg/kg) (41, 42).

Moisture content and water activity versus fungi and aflatoxins in raw Brazil nuts.

As expected, the mc mean of the raw Brazil nuts were high and so was the a_w , as they were collected directly from the forest with no treatment or processing at all. The a_w obtained were similar to those commonly reported for *A. flavus* growth in different commodities (43). The a_w for shelled nuts were 0.83 for Western and slightly higher, 0.88, for Eastern (**Table1**). The mc mean for in-shell samples was 30.4 (Eastern) and 28.0 % (Western). In a more recent study carried out by Arrus et al (24) specifically for processed Brazil nuts, it was showed that the optimal conditions for *A. flavus* growth on those nuts, after 30 days storage, were mc 8.6 and a_w 0.91 at RH 97 % and 30 °C. They reported also the limiting mc and a_w of 4.5 and 0.68, and 5.0 and 0.75, for shelled and in-shell nuts fungal growth at those same temperature and time. However, in practice, nuts in the factory do not stay stored longer than two days prior to processing. Despite the conditions mentioned above, those data were obtained from store dried nuts and our findings are from raw nuts. The high mc and a_w obtained in the raw nuts indicate the need for good management practices to be applied previously, in the extractive (forest and city storage) and transport activities prior to their arrival to the factory. It is necessary to develop a more efficient system of drying in the forest prior to river transport and also the improvement of aeration on the boats. This should also be applied at the factory raw nut reception in order to select the healthy ones with lower mc, fungi and aflatoxins. If the raw Brazil nuts that get to the factory are already contaminated with aflatoxins or with a high load of fungal deterioration, the final product (in-shell nuts) may still have some contamination. The drying temperature (two steps with ca. 70 °C) is not enough for aflatoxin degradation, even if fungi can be reduced and surface shell spoiled nuts sorted. The situation could be different if the nuts are to be sold shelled dry, as they pass through two sorting steps, at de-shelling and classification tables, thus discarding the spoiled nuts prior to vacuum packing.

Se versus aflatoxins

Whereas Se is an important antioxidant in human metabolism to prevent cancer, aflatoxins are highly carcinogenic. Data showed that the raw Brazil nuts were rich in Se

and presented some aflatoxins levels. Although aflatoxin levels were not very high, they were detected, especially due to the high sensitivity of the methodology of detection used (MS/MS). In addition, aflatoxin have also been reported as contaminating processed dry nuts (44). Se content in Brazil nuts from the two nut-producing Amazon regions and their aflatoxin levels were higher in the Eastern than Western regions. High Se content has been reported causing oxidative stress to organisms (36). These data lead to a question: is there a relation between the Se level and aflatoxin production in the Brazil nuts? These high Se content might also cause oxidative stress on fungus strains, activating the mechanisms for secondary metabolites production. Depending on the levels, Se could activate *flavus* aflatoxigenic strains to aflatoxin production, thus contaminating Brazil nuts, at the first and second storage stages in the forest and after processing, as long as spores and optimum conditions for fungi growth are present. Another factor for aflatoxin production could be the interaction and competition with different strains of *Aspergillus* in order to affect aflatoxin production as well (45).

Acknowledgements

The authors thank to FAPEAM (Amazon State Research Foundation) for supporting the research.

3.5 Literature Cited

- (1) Chunhieng, T., Petritis, K.; Elfakir, C.; Brocher, J.; Goll, T.; Montet, D. Study of selenium in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**. 52, 4318-4322.
- (2) Moreno, F. J.; Jenkins, J. A.; Mellon F. A.; Rigby, N. M.; Robertson, J. A.; Wellner, N.; Clare, M. E. N. Mass spectrometry and structural characterization of 2S albumin isoforms from Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*). *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**. 1698, 175-186.
- (3) Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S.; Streich, R.; Marx, F. Seed composition of Amazonian *Lecythidaceae* species: Part 3: Studies of edible Amazonian plants. *J. Food Comp. Anal.* **1999**. 12, 37-51.
- (4) Barclay, M.N.I.; McPherson, A.; Dixon, J. Selenium level of a range of UK foods. *J. Food Comp. Anal.* **1995**. 8, 307-318.
- (5) Bowen, H. J. M. Trace Elements in Biochemistry, Academic Press, New York, **1966**.
- (6) Ip C.; Lisk, D.J. Enrichment of selenium in *Allium* vegetables for cancer prevention. *Carcinogenesis*, **1994**. 15(9), 1881-1885.

- (7) Furr, A.K.; MacDaniels L.H.; St John, L.E.; Gutenmann W.H.; Pakkala I. S.; Lisk, D.J. Elemental composition of tree nuts. *Bull. Environ. Contaminant Toxicol.* **1979**, 21, 392-396.
- (8) Coutinho, V.F.; Bittencourt, V.B.; Cozzolino, S.M.F. Effects of supplementation with Brazil nuts (CP, *Bertholletia excelsa* H.B.K.) in capoeira players on selenium (Se) concentration and glutathione peroxidases activity (GSH-PX, E.C.1.11.1.9). In: Trace Elements in Man and Animal. Springer, Part II. 2002.
- (9) Souza, M.L.; Menezes, H.C. Processing of Brazil nut and meal and cassava flour: quality parameters. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2004**. 24,120-128.
- (10) Thomson, J.N.; Erdody, P.; Smith, D.C. Selenium content of food consumed by Canadians, *J. Nutr.* **1975**. 105, 274-277.
- (11) Diaz-Alarcon, J.P.; Navarro-Alarcon, M.; Lopez-Garcia de la Serana, H.; Lopez-Martinez, M.C. () Determination of selenium in meat products by hydride generation atomic absorption spectrometry-selenium levels in meat, organ meats and sausages in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1996**. 44, 1494–1497.
- (12) Foster, L.H.; Sumar, S. Selenium in health and disease: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1997**. 37, 211–228.
- (13) NAS- National Academy of Sciences (US). In: Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. **2000**. <http://www.nap.edu/catalog/9810.html>. Accessed 23/04/07.
- (14) Brazil. Ministry of Development, Industry and Commerce. Dec. L. n°356, Art. 1° § 1, from 15/08/1968. **1968**.
- (15) Secor, C.L.; Lisk, D.J. Variation in the selenium content of individual Brazil nuts. *J. Food Safety*, **1989**, 9, 279-281.
- (16) Chang, J.C.; Gutenmann, W.H.; Reid, C.M.; Lisk, D.J. Selenium level of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. *Chemosphere*. **1995**. 30, 801-802.
- (17) **Vonderheide, A. P.; Wrobel, K.; Kannamkumarath, S. S.; B'hymer C.; Montes-Bayon, M.; Ponce de Leon, C.; Caruso, J. (). Characterization of selenium species in Brazil nuts by HPLC-ICP-MS and ES-MS. *J. Agric. Food Chem.* 2002. **50**, 5722-5728.**
- (18) Scussel, V.M. Aflatoxin and food safety: Recent South American perspectives. *Toxicol. Toxin Rev.* **2004**. 23, 179-216.
- (19) Marklinder, I.; Lindblad, M.; Gidlund, A.; Olsen, M. Consumer's ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. *Food Addit. Contam.* **2005**. 22, 56-64.
- (20) Freire, F.C.O.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R.M. Mycoflora and mycotoxins in Brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, **2000**. 149, 13-19.
- (21) Freire, F.; Offord, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. *Braz. J. Microbiol.* **2002**. 33, 145-148.

- (22) Bayman, P.; Baker, J.L.; Mahoney, N.E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia*. **2002**. 155, 161-169.
- (23) Arrus, K.; Blank, G.; Clear, R.; Holley, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *J. Stor. Prod. Res.* **2005a**. 41, 513-527.
- (24) Arrus, K.; Blank, G.; Clear, R.; Holley, R.A.; Abramson, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *J. Food Prot.* **2005b**. 68, 1060-1065.
- (25) Pacheco, A.M.; Scussel, V.M. Brazil Nut: From the Tropical Forest to Consumer. **2006**. Editograf. 173pp.
- (26) Castrillon, A.L.; Purchio, A. Aflatoxin occurrence in Brazil nuts. *Acta Amazonica*. **1988**. 18, 49-56.
- (27) EU - European Union (1998). Commission Directive 98/53/EC of 16 July 1998, laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuff. *Off. J. Eur. Comm.* 17.7.98, L 201/93.
- (28) US EPA - United States Environmental Protection Agency. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. SW-846 test methods for evaluating solid wastes physical/chemical methods. Method 6010B. **1996**.
- (29) Xavier, J.J. & Scussel V.M. (2007). Development of methodology by LC-MS/MS for aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in Brazil nuts for export. *Mycotox. Res.* In press.
- (30) De-Mello, F.R. & Scussel, V. Characteristics of in-Shell Brazil nuts and their relation to aflatoxin contamination – Criteria for sorting. *J. Agric. Food Chem.* **2007**. In press.
- (31) AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th, Horwitz, W. and Latimer, G. W. Jr. eds. Gaithersburg, Maryland, USA. **2005**.
- (32) Pinheiro, M.C.N.; Muller, R.C.S.; Sarkis, J.E.; Vieira, J.L.F.; Oikawa, T.; Gomes, M.S.V.; Guimarães, G.A.; Nascimento, J.L.M.; Silveira, L.C.L. Mercury and selenium concentrations in hair samples of women in fertile age from Amazon riverside communities. *Sci. Total Environ.*, **2005**. 349, 284–288.
- (33) Nogueira, B. Minerals in the Amazon region - Report.: *Amazon Soil Management*, **2000**. 5-6.
- (34) FAO- Food and Agriculture Organization. FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements. *Chapter 5. Selenium*. **1993**. 235-255.
- (35) Reid, M.E.; Stratton, M.S.; Lilico, A.J.; Fakih, M. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2004**. 18, 69-74.
- (36) Letavayová, L.; Vicková, V.; Brozmanová, J. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*, **2006**. 227, 1-14.

- (37) Lima, A.P.S.; Sarkis, J.E.S.; Shihomatsu, H.M.; Muller, R.C. Mercury and selenium concentrations in fish samples from Cachoeira do Piriá Municipality, Para State, Brazil. *Environ. Res.* **2005**, *97*, 236-244.
- (38) Uysal, H.; Agar, G. Selenium protective activity against Aflatoxin B1 adverse effects on *Drosophila melanogaster*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2005. **48**, 227-233.
- (39) Palmer, I.S.; Herr, A.; Terri N. Toxicity of Selenium in Brazil Nuts to Rats. *Journal of Food Science*. 1982. **47**, 1595–1597.
- (40) Wessman, G.S.; Trelease, S.F. Influence of Sulfur on the Toxicity of Selenium to *Aspergillus*. *Amer. Journ. of Botany*. **1955**. *42*, 489-495.
- (41) Mercosur. Technical Regulament on maximum limits for aflatoxins. Internal correspondence - MERCOSUL/GMC, 56/94. **1994**.
- (42) FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations -Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, FAO Food and Nutrition Paper no. 81, FAO, Rome, Italy. **2004**.
- (43) Pitt, J.L.; Mischamble, B.F. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *J. Food Prot.* **1995**. *58*, 86-90.
- (44) Caldas, E.; Silva, S.C.; Oliveira, J.N. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. *Rev. S. Publica*. **2002**. *36*, 319-323.
- (45) Martins, H.M.; Martins, M.L.; Bernardo, F.A. Interaction of strains of non-toxigenic *Aspergillus flavus*, with *Aspergillus parasiticus* of aflatoxin production. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* **2000**. *37*.

Table 1 Selenium and Aflatoxin Levels in Raw Brazil Nut Samples from Western and Eastern Regions of Amazon Basin

Amazon Basin	Brazil nut	Selenium ^a (mg/kg)			AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂ ^b (µg/kg)			Mc ^c (%)			a _w ^d	
Region	City	Type	Mean	Range	RSD ^e (%)	Mean ^f	Range	RSD (%)	>EU limit ^g (%)	Mean	Range	RSD (%)
EASTERN												
ITACOATIARA												
		In-shell ⁱ	20.5 ^j	11.1-34.7	9.3	6.1 ^j	2.4-11.5	2.0	7 (7.9)	26.7	21.6-30.4	3.3
		Shelled	43.7 ^l	23.7-61.0	10.6	4.5 ^l	1.7-11.9	3.0	3 (9.5)	21.1	14.6-25.4	3.6
AUTAZES												
		In-shell	29.2 ^j	12.9-38.6	5.2	3.8 ^j	2.0-9.2	2.0	5 (6.7) ^e	25.9	23.4-28.3	1.7
		Shelled	43.9 ^l	20.7-69.7	17.1	3.0	3.3-8.0	2.0	3 (7.9)	22.5	15.6-27.8	3.7
WESTERN												
BOCA DO ACRE												
		In-shell	13.5 ^j	9.7-18.5	3.4	1.5 ^j	1.8-4.5	1.0	1 (4.5)	21.2	20.1-23.4	1.1
		Shelled	25.3 ^l	13.8-35.1	7.1	1.5 ^l	2.2-5.5	2.0	1 (5.5)	24.3	20.6-20.4	2.8
AMATURA												
		In-shell	11.9 ^j	9.2-16.7	2.8	2.5	1.2-3.7	1.4	0	23.2	20.9-28.0	2.3
		Shelled	21.8 ^l	8.5-29.1	6.2	3.0	1.9-6.6	1.3	2 (5.4)	26.2	23.7-28.9	1.9
										0.82	0.79-0.84	0.02
										0.83	0.80-0.86	0.02

^a: LOQ: 2.00 mg/kg ^b total aflatoxins: LOQ of 0.39 µg/kg ^c moisture content ^d water Activity ^e relative standard deviation ^f levels of total aflatoxin in the samples ^g number of samples with aflatoxin levels higher than the European Union limit of total aflatoxin: 4.0 µg/kg ^h shell included ⁱ mean Se for in-shell/shelled nut ^j same letters presented significant difference, for in-shell samples, concerning the two regions (Eastern and Western) ^l same letters presented significant difference, for shelled samples, concerning the two regions (Eastern and Western).

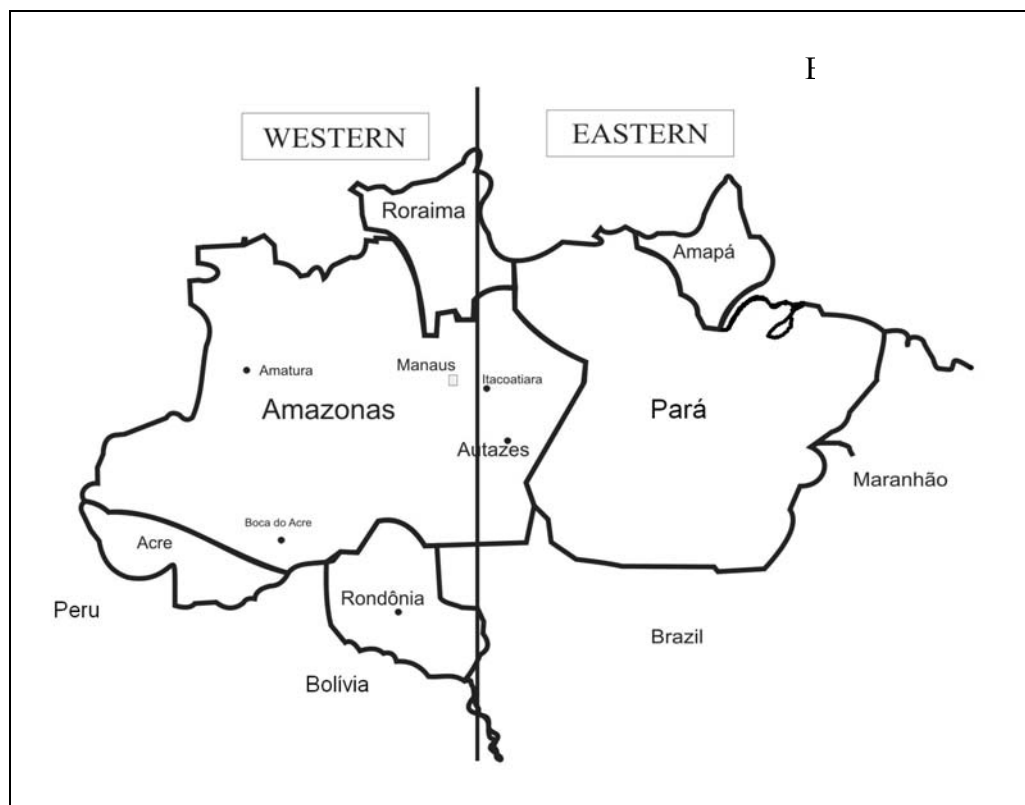


Figure 1 A. Brazil nut tree distribution in the South American Amazon basin - Western (occidental) and Eastern (oriental) regions. [---] delimited area of the Brazil nut tree distribution. [•] some of the major extractive areas of Brazil nuts; B. Northern Brazilian States comprising the Amazon basin, and the sites of sample collection (Eastern region: Itacoatiara and Autazes cities; Western region: Boca do Acre and Amaturá cities).

4 ARTIGO

AVALIAÇÃO DE AFLATOXINAS EM CASTANHA-DO-BRASIL TIPO EXPORTAÇÃO DAS SAFRAS DE 2006 E 2007, POR LC-MS/MS

Trabalho submetido à publicação na revista: Postharvest Biology and Technology

AValiação DE AFLATOXINAS EM CASTANHA-DO-BRASIL TIPO EXPORTAÇÃO DAS SAFRAS DE 2006 E 2007, POR LC MS/MS

4.1 Resumo

Castanha-do-Brasil com casca e descascada processada em duas safras foram avaliadas quanto ao teor de aflatoxinas (AFLs) por LC MS/MS. O total de 171 amostras tipo exportação, compreendendo 108 *com casca* e 63 *descascadas* (nos tamanhos: *large*, *medium* e *small*) coletadas em uma usina de beneficiamento localizada na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, na Amazônia brasileira. As amostras foram coletadas de *big bags* (*com casca*) e mesas de classificação (*descascada*), imediatamente após o processamento de Abril a Maio nas safras de 2006 e 2007. Além de AFLs, as amostras foram analisadas quanto ao teor de umidade e atividade de água (a_w). As condições ambientais (UR % e Temperatura) dentro e fora da usina também foram monitoradas durante o período de amostragem. Do total analisado nas duas safras e para todos os tipos, somente 7,4 % (13) estavam $>4 \text{ ng.g}^{-1}$ (legislação UE), em que 11 e 3 para *com casca* e *descascada*, respectivamente. A safra de 2007 apresentou menor número de amostras com teor de AFLs acima da legislação europeia, com 2 para cada um de ambos os tipos (*com casca* e *descascada*). O método foi seletivo, sensível e rápido (tempo total: 5 min), sem necessidade de confirmação e com LQ $0,390 \text{ ng.g}^{-1} \sum \text{AFLs}$ e $0,08 \text{ ng.g}^{-1}$ de AFB₁. A umidade média para amostras com casca foi de 8,1 e 7,9 %, e, *descascada* 2,1 e 2,3 %, para 2006 e 2007 respectivamente. Os níveis de a_w foram similares nas duas safras com média de 0,61 (0,53-0,69) para *com casca* e 0,61 (0,52-0,68) para *descascada*. O ambiente interno da usina apresentou níveis de UR % de 77,1-95,8 % (2006) e 76,9-91,0 % (2007), em que o maior teor ocorreu em Abril. É necessário enfatizar, quanto à contaminação por AFLs, que o consumidor tem habilidade de identificar castanhas com casca, deterioradas, e que serão descascadas antes do uso. Apesar das amostras terem sido analisadas em sua totalidade, incluindo eventualmente alguma deteriorada, conforme exigência da legislação.

Palavras-chaves: aflatoxina, *Bertholletia excelsa*, LC MS/MS, a_w

4.2 Introdução

A Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) *com casca* é processada (seca) utilizando nozes *in natura* coletadas diretamente da floresta Amazônica por meio do extrativismo, selecionadas e avaliadas na recepção de usinas de beneficiamento. Após o processamento, a castanha-do-Brasil pode ser mantida *com casca* ou *descascada* para exportação ou comercializada no país (Pacheco e Scussel, 2006a). A amêndoa pode ser consumida inteira ou em pedaços e também utilizada pela indústria de alimentos como ingrediente, com os benefícios do elevado teor de proteínas (com aminoácidos sulfurados), lipídios (ácidos graxos essenciais) e minerais, especialmente selênio (Chang et al, 1995; Andrade et al, 1999; Chunhieng, et al, 2004; Souza e Menezes, 2004; Ryan, et al, 2006). As castanhas são provenientes de áreas tropicais e são expostas ao ambiente da floresta com elevado teor de umidade relativa (UR %), normalmente acima de 80 %, e de temperaturas ($> 25^{\circ}\text{C}$). Tais condições podem permitir o crescimento de fungos, como os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* que podem produzir aflatoxinas (AFLs) compostos hepatotóxicos e carcinogênicos (Pitt, 1999, Pacheco e Scussel, 2006a). Algumas cepas com propriedades aflatoxigênicas de *Aspergillus*, principalmente *flavus* foram detectadas em castanha-do-Brasil (Castrillon e Purchio, 1988; Freire, et al, 2000; Bayman et al, 2002; Simsek, et al., 2002; Souza, et al, 2003; Arrus, et al, 2005a, 2005b) assim como diferentes teores de AFLs (Castrillon e Purchio, 1988; Steiner et al, 1992, Ioannou-Kakouri et al, 1999; Freire, et al, 2000; Thuvander et al, 2001; Caldas et al, 2002; Scussel, 2004). Entretanto, alguns trabalhos não detectaram AFLs em castanha-do-Brasil (Kershaw, 1985; Candlish et al, 2001) ou detectaram baixos níveis (Pacheco e Scussel, 2007). A exportação da castanha-do-Brasil ocorre para o Canadá, Estados Unidos e países Europeus, dentre outros desde 1950. Mais recentemente, tem ocorrido demanda para países do Oriente, como a Austrália, China, Hong Kong, Japão e Vietnam. Entretanto, desde 1998 um decréscimo do volume de exportação foi relatado, afetado principalmente pela Comunidade Européia (CE, 2003) que reduziu o limite máximo aceitável de ΣAFL de 4 ng.g^{-1} e AFB_1 de 2 ng.g^{-1} (UE, 1998a; 2003). Apesar disso, essa diretriz não especifica sua aplicação para que tipo de produto (com casca ou descascada). Desde então, este fato tornou-se um obstáculo para a exportação produto brasileiro para o comércio com a União Européia (UE). Recentemente, UE não efetuou nenhuma importação de castanha-do-Brasil, das beneficiadoras brasileiras (Olsen, 2007), apesar de que somente de 5 a 10

% da produção ficar no Brasil (Pacheco e Scussel, 2006a). Devido ao embargo da UE, nos últimos anos, grande parte da produção brasileira tem sido exportada para a Bolívia a preços menores e esse procedimento tem sido cada vez mais freqüente, de forma que aquele país tornou-se o principal exportador de castanha-do-Brasil, mesmo sabendo-se que o Brasil é o maior produtor, com área castanhais de 3.200.000 km², muito maior que os outros países produtores, como a Bolívia (100.000 km²) e o Peru (84.824 km²) (IBGE, 2007). Apesar de não haver muitos dados oficialmente publicados sobre AFLs em castanha-do-Brasil, somente informações esporádicas, esses dados na maioria não especificam a origem e tamanho das amostras, procedimentos de amostragem e preparo da amostra analítica, como elas são comercializadas (se *com casca* ou *descascada*) ou ainda se estavam in natura ou processadas (secas). Alguns desses trabalhos usaram poucas ou apenas uma amostra (Kershaw, 1985; Tabata et al 1993; Freire et al, 2000; Caldas et al, 2002) e que não representam de fato a situação. O procedimento analítico convencional utiliza, principalmente, a cromatografia em camada delgada (CCD), Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ou associados, mas que têm sensibilidade variável requer confirmação e consomem maior tempo, quando comparados com LC *tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS). Este trabalho reporta o uso do método de LC-MS/MS para avaliar os níveis de AFLs em castanha-do-Brasil processada *com casca* e *descascada* tipo exportação, seguindo a diretriz de amostragem da EU, e a comparação dos resultados em das amostras das safras dos anos de 2006 e 2007. É o primeiro estudo dos níveis de AFL em elevado número de amostras de castanhas *com casca* e *descascadas*, obtidas diretamente de uma usina de beneficiamento, antes do embarque para exportação, em safras distintas e seguindo o plano de amostragem da UE.

4.3 Material e Métodos

Material

Amostras: castanha seca *com casca* e *descascada*, e segundo legislação oficial (Brasil, 1998), classificada em três tamanhos: *large*, *medium* e *small*. Foram coletadas após o processo de secagem de uma usina localizada no Estado do Amazonas, na região da Amazônia brasileira, safras de 2006 e 2007.

Reagentes: acetonitrila, metanol (HPLC), Carlo Erba. Acetato de amônio (p.a), Vetec. Água Ultrapura (mili-Q, Millipore). Padrões de AFLs: AFB₁, AFB₂, FG₁ e AFG₂, Sigma.

Equipamentos e utensílios: cromatógrafo líquido 1100, Agilent; detector *tandem mass*, API 4000, Applied Biosystems MDS SCIEX e espectrofotômetro, Femto. Coluna C₈ (45 mm, 150 mm, 5 µm), Hichrom. Estufa, Fanem. Analisador de A_w, Decagon Paw kit, Termohigrômetro, Incoterm. Para coleta e prepare da amostras: coletor inox para castanha-do-Brasil (formato cônico, 500 mm de largura e 150-50 mm diâmetro interno, com capacidade de 2 kg); descascador industrial, CIEX; moinho industrial, Caf; liquidificador industrial, Metvisa. Bandejas (400 x 250 mm) e tesouras. Sacos de ráfia/juta (20-40 kg).

Métodos

Amostragem: 171 amostras de castanha-do-Brasil foram coletadas após o processamento (secagem) durante o período de Abril-Maio nas safras de 2006 (n=108) e 2007 (n=63). Dois tipos de produtos finais foram coletados (*com casca e descascada*). *Com casca:* de sacos de ráfia (63 e 36 em 2006 e 2007, respectivamente). *Descascadas:* de cinco pontos de mesas de classificação, depois do resfriamento e preparadas para embalagem a vácuo (45 e 27 para cada safra). O número de amostras de cada tamanho, por cada tipo de castanha está apresentado na Tabela 1. O procedimento de amostragem ocorreu segundo as diretrizes da União Européia (EU, 1998b), com auxílio de coletores inox e as amostras homogeneizadas manualmente em recipientes higienizados, e as porções finais de 12 (com casca) e 6 kg (descascada) retiradas para análise. Os pontos de coleta foram: (a.1) Sacos de ráfia (superior, meio e base = três pontos) e (a.2) mesas de classificação (cinco pontos) de lotes < 1 ton. As amostras foram, então, moídas, homogeneizadas e porções de 25g utilizados para análise de AFLs.

Análise de AFLs por LC-MS/MS: as análises foram realizadas segundo o método de Xavier e Scussel (2007) com *Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)*, no modo positivo, em condições de: coluna C₈, fluxo na proporção de 1 mL/min e fase móvel de metanol:água (5 min). Cinco pontos foram usados para construir a curva analítica e obtenção dos valores de coeficiente de correlação (R). Os limites de detecção (LD) e de Quantificação (LQ) para ΣAFLs foram: 0,195 e 0,39 ng.g⁻¹, respectivamente.

Teor de Umidade %: foi utilizado o método gravimétrico (AOAC, 2005).

Teor de Atividade de água (a_w): foi obtido com uso de Pawkit e calibração conforme AOAC (2005).

Fatores Ambientais: dados sobre UR % e temperatura foram obtidos durante o período de amostragem das duas safras (Abril-Maio), dentro e fora da usina. O índice de precipitação pluviométrica foi obtido do Instituto Brasileiro de Meteorologia (Manaus-AM).

Análise Estatística: foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias comparadas pelo teste de Tukey (Montgomery, 2001).

4.4 Resultados e Discussão

Castanha-do-Brasil processada e níveis de aflatoxina nas safras de 2006 e 2007

As AFLs foram detectadas em algumas das amostras de castanha-do-Brasil estudadas. Os níveis e o total de amostras positivas foram claramente diferentes para os dois tipos de amostras. Castanhas destinadas principalmente à exportação (*com casca*) apresentaram maiores níveis de AFLs do que as *descascadas*, independente da safra estudada ou do tamanho da castanha. Foi observada, ainda, redução dos níveis de AFLs nas amostras processadas na safra de 2007, em relação a 2006.

(a) Castanha-do-Brasil Com Casca

O nível de AFLs do total de amostras *com casca* (99) e de diferentes tamanhos (*large*, *medium* e *small*), coletadas após o processamento, durante duas safras está apresentado na Tabela 1. Do total de amostras analisadas em 2006 (63) para castanha com casca, 9 (14,5 %), apresentaram AFLs, com maior número de amostras positivas do que em 2007, com 2 (5,5 %) amostras. Esses resultados, foram em níveis de AFLs acima de 4 ng.g⁻¹ (limite UE) e somente 4 delas, acima de 15 ng.g⁻¹ (Canadá, USA e Mercosul MRL) sendo da safra de 2006. É neccessario ressaltar que ao final de 2005, no período de queda dos frutos (ouriços) das árvores e coleta na floresta, ocorreu na região do Amazonas a seca mais severa, desde 1953. Tal situação pode ter levado a queda prematura de alguns ouriços, com a maturação incompleta ou extremamente secos, reduzindo a resistência da semente à infecções ou promovendo rachaduras em sua estrutura. Esta pode ser uma justificativa para que três amostras apresentassem níveis acima de 15 ng.g⁻¹ (145,2, 379, 865 ng.g⁻¹) e estivessem visualmente

deterioradas. Os ouriços dispostos no chão da floresta podiam permitir que ocorresse a infestação por insetos e/ou proliferação de fungos através da casca. Por outro lado, quando as castanhas de 2007 foram avaliadas apresentaram níveis mais baixos, com variação de 1,6 a 6,0 ng.g⁻¹. Somente 2 amostras, de 36, estavam >4 ng.g⁻¹ e nenhuma >15 ng.g⁻¹. Considerando as duas safras, somente 11 amostras estavam >4 ng.g⁻¹ e somente nas amostras da safra 2006 haviam amostras (total=4) com níveis >15 ng.g⁻¹ (legislação do Canadá, EUA e Mercosul). Somente alguns trabalhos relataram dados sobre AFLs em castanha-do-Brasil *com casca* e a maioria era obtida no varejo. Castrillon e Purchio (1988) analisaram 100 amostras processadas (secas), sendo duas amostras positivas *com casca*, e os autores avaliaram apenas AFB₁ e AFG₁ com total de AFL de 1,13 e 3,75 ng.g⁻¹, para cada amostra positiva. Arrus et al. (2005) analisaram amostras *aw com casca in natura* de 15 ouriços e não detectaram AFLs. As AFLs também não foram detectadas em castanha-do-Brasil com casca coletada diretamente da floresta (Cartaxo et al., 2003). A contaminação encontrada em amostras processadas pode ter sido desenvolvida durante as etapas de armazenamento e transporte até a usina de beneficiamento.

É necessário esclarecer que todas as castanhas incluídas na amostra analítica utilizada para determinação de AFLs foram usadas após a retirada da casca, inclusive as deterioradas. Além disso, os níveis de AFLs encontrados para castanha-do-Brasil não correspondem a real situação de consumo, pois o consumidor pode descartar aquelas visualmente deterioradas (cor, aparência, presença de fungos, e textura) e odor estranho, antes ou depois de descascá-la (Marklinder et al., 2005, Pacheco e Scussel, 2006b). De fato, algumas castanhas *com casca* da amostra analítica tinham aparência escurecida, com alguns pontos de fungos e tinham odor estranho, enquanto que a castanha-do-Brasil saudável, quando são descascadas possuem coloração esbranquiçada, diferente de pistache, por exemplo, que é mais visualmente descartável quando deteriorado ou com a presença de fungos. De qualquer forma, a castanha-do-Brasil não é consumida com casca e os níveis de AFL detectados, não representam em nenhuma das condições citadas, um hábito de consumo regular para a maioria dos consumidores e os países importadores também irão descascá-la para ser usadas em qualquer finalidade alimentícia.

(b) Castanha-do-Brasil descascada

Por outro lado, quando as descascadas (72) foram analisadas a situação foi diferente. Amostras da safra de 2006 (45), coletadas após passar pelas mesas de Classificação tiveram apenas uma amostra (2,2 %), de tamanho médio, com nível de $\Sigma\text{AFL} > 4 \text{ ng.g}^{-1}$ ($11,2 \text{ ng.g}^{-1}$) e nenhum $> 15 \text{ ng.g}^{-1}$. Utilizando o método de LC-MS/MS, que é bastante sensível, foi possível detectar níveis muito baixos de AFLs ($\text{LQ} = 0,39 \text{ ng.g}^{-1} \Sigma\text{AFL}$). As amostras da safra de 2007 também apresentaram melhor resultado que as de 2006, pois as ΣAFL estava $> 4 \text{ ng.g}^{-1}$ apenas em 2 amostras (4,2 e 7,4) e nenhuma $> 15 \text{ ng.g}^{-1}$.

A vantagem da castanha-do-Brasil descascada é que ela passa por três etapas de classificação/seleção no beneficiamento: na retirada da casca (quebra), mesas de classificação, além da seleção prévia antes da quebra. A Figura 4 demonstra as etapas de seleção as quais a castanha descascada é submetida. Tais etapas permitem o descarte de deterioradas e não-conformes ao padrão para beneficiamento, reduzindo fortemente a possibilidade de contaminação. Ao final do processo de secagem e resfriamento, o produto ainda é submetido à embalagem a vácuo, que é conduzido com a utilização de um filme metálico (Polinyl 71517-R), 545 mm de largura, 925 mm altura, $120 \mu\text{m}$ de densidade, com $< 5,00 \text{ TPO}_2$ de permeabilidade ao O_2 (marca Itap Bemis) e selagem quente. Quanto aos níveis de AFB_1 , não foi detectada contaminação $> 2 \text{ ng.g}^{-1}$ em nenhuma das amostras descascadas, ao contrário das amostras com casca. Os dados de comparação das diferenças entre as médias de AFL, apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.05$), de acordo com o teste de Tukey, em relação aos níveis da castanha com casca.

Diferentemente da castanha *com casca*, há um pouco mais de informação na literatura para castanhas *descascadas*, apesar de que, normalmente foram coletadas de pacotes comerciais do varejo, com pequeno volume total de amostra ($< 250 \text{ g}$) e não especificam a origem das amostras, tamanho total da amostra, como foram comercializadas ou estágio da vida-de-prateleira. Em estudo de AFLs efetuado por Kershaw (1985) em nozes comestíveis, as AFLs não foram detectadas em castanha-do-Brasil, apesar de que o autor só analisou uma amostra; Freire et al. (2000) analisaram total de 4 amostras e dividiram-nas em: boa e baixa qualidade. Eles detectaram AFL somente nas de baixa qualidade em nível de $29,2 \text{ ng.g}^{-1}$; Caldas et al 2002 analisaram por CCD, nozes comestíveis e milho e do total de 366 amostras,

somente 9 de castanha-do-Brasil, em que três foram positivas variando de 48-294 ng.g⁻¹. Tabata et al 1993 analisaram AFLs em 540 amostras de nozes de árvores e seus produtos, e dentre estes, quatro eram de castanha-do-Brasil, com apenas uma amostra positiva com 14,5 ng.g⁻¹ de AFLs; Ioannou-Kakouri et al (1999) analisaram 4709 nozes e seus produtos no período de 1992-1996, dentre estas, 51 amostras eram de castanha-do-Brasil, com 10 positivas e média de 21 ng.g⁻¹ para AFB₁.

(c) Fatores ambientais versus níveis de AFLs

UR % e temperatura: as amostras foram coletadas na estação chuvosa, de forma que o índice pluviométrico e outros fatores ambientais (T °C e RH) e que poderiam influenciar no crescimento fúngico e produção da AFL foram monitorados na usina, nas duas safras. Como esperado, em Abril e Maio (período da safra), houve índice pluviométrico elevado com média de 496,2 e 440,3 mm, em 2006 e 2007, respectivamente. A UR % fora da usina variou de 80,3-96,2 % em Abril e 80,0-93,1 % em Maio em 2006, com média de 85,6 %. Situação similar foi registrada na safra de 2007. Quanto às condições no ambiente interno da usina (Figura 3) a UR % foi de 77,1-92,8 % nos dois meses de 2006 e de 76,9-91,0 % em 2007. A usina armazenava os produtos em temperatura ambiente, durante o período do estudo variando de 24,4-29,9 °C e com média de 27,6 °C. Em 2007, os índices encontrados foram semelhantes com média de 26,3 °C e variação de 23,6-30,0 °C.

Normalmente o tempo de armazenamento do produto *in natura* antes do processamento é curto (de 1-2 dias, na maioria das vezes) e em seguida são processadas e despachadas para embarque em prazo de 5-15 dias. As condições ambientais da região Amazônica são apropriadas ao crescimento fúngico, de forma que, a castanha *in natura* ao chegar à usina necessita ser criteriosamente avaliada na recepção, quanto à presença de microrganismos aflatoxigênicos, AFLs, aspecto e a_w , antes de aceitá-la para processamento, mesmo considerando que o teor de umidade é continuamente verificado na usina, para definir a duração das etapas de secagem, já que a castanha *in natura* chega à usina com teor muito variável de umidade de 15-30 %.

Teor de Umidade e a_w : considerando que o objetivo da usina é obter o teor de umidade em torno de 8,5 % ao final do processamento da castanha *com casca*, como esperado, o teor de umidade para amostras *com casca large*, da safra de 2006 com

média de 8,7 % (8,0-10,0 %) e para amostras de 2007 de 8,4 % (7,2-12,0 %), conforme Figura 4. De acordo com as etapas de secagem as quais a castanha-do-Brasil são submetidas, as amostras apresentaram teor de umidade abaixo do limite máximo aceito para comércio internacional de 13 ± 2 % (Brasil, 2004), conforme a Tabela 2. A maior média de a_w foi detectada em amostras de tamanho médio, na safra de 2007 com 0.63 (0.58-), que ainda assim é considerada segura quanto ao crescimento de fungos toxigênicos em castanha-do-Brasil, ou seja, $<0,70$ (Codex Alimentarius, 2006). Como esperado, dados de castanha-do-Brasil *in natura* e *com casca* recebida pela usina no período do estudo tiveram alta umidade (aproximadamente 24 %), entretanto, ao final do processamento este teor é reduzido para níveis seguros (Tabela 2). As amostras *descascadas* apresentaram teor de umidade mais seguro de 2,1 % e 2,3 %, para as safras de 2006 e 2007, respectivamente. Em um estudo realizado por Arrus et al. (2005a), especificamente para castanhas processadas, os autores relataram que as condições ótimas para o crescimento de *A. flavus* (após 30 dias de armazenamento) foram com teor de umidade de 8,6 % e a_w 0,91 em UR % de 97 % e 30°C. Relataram ainda os teores limites de umidade e a_w de 4,5 e 0,68, e, 5,0 e 0,75 para *descascada* e *com casca* e o crescimento fúngica no mesmo período e temperatura. Na prática, entretanto, as castanhas-do-Brasil ao chegarem à usina, não ficam estocadas por muito tempo, antes do processamento (média=2 dias) e o tempo de armazenamento após o processo é de 5-15 dias em média. Considerando as características ambientais da região, é prudente por parte da usina em manter um programa de monitoramento para controlar o ambiente interno do processamento para UR e T° C, e alguns parâmetros (umidade e a_w) da castanha *in natura* recebida. Da mesma forma, é importante controlar de forma rígida as etapas de secagem para obter um produto homogêneo com baixa umidade em todo o lote nos secadores utilizados, já que estes atingem temperaturas de 60-85 °C e o processo pode ter duração de 9 ± 3 h dependendo do teor de umidade do material *in natura*. O processo de secagem abrange duas etapas (*com casca*) e ainda é beneficiado pelas etapas de seleção (Figura 4) que levam à umidade segura e manutenção dos padrões de qualidade. Entretanto, considerando o tempo necessário e as restrições nos portos de embarque do produto acabado, seria recomendável promover a secagem em nível de 2% abaixo dos limites considerados seguros. Embora, o material *in natura* não fique armazenado muito tempo antes do processamento, é necessário aplicar mecanismos para controlar

também as temperaturas nos silos iniciais e nas áreas de produto acabado, inclusive da castanha descascada. Tais mecanismos podem ser exemplificados, com a aplicação de aeração e, se possível, refrigeração (10-17 °C) para reduzir a formação de esporos de fungos. Se a temperatura for menor que a citada pode levar a formação de vapores de condensação, quando transportar o produto para embarque, já que a temperatura ambiente da região é elevada e diferente das condições dos contêineres e navios de transporte.

Método de LC MS-MS x Castanha-do-Brasil

O método de LC MS/MS para avaliação de AFL em castanha-do-Brasil demonstrou ser seguro, sensível e rápido, com excelente seletividade. O LQ para cada toxina foi bastante baixo de 0,08, 0,09, 0,10 e 0,12 ng.g⁻¹, (AFB₁; AFB₂; AFG₁ e AFG₂, respectivamente) com LQ Σ AFLs de 0,39 ng.g⁻¹. Os resultados tiveram reprodutibilidade e auto-confirmatórios, como em um sistema Massa/Massa (Zollner e Mayer-Helm, 2006). O percentual de recuperação para os extratos de AFLs contaminados em diferentes concentrações variou de 92-100 %. Com base nos dados obtidos e no desempenho, o método demonstrou ser bastante aplicável para castanha-do-Brasil e para atender os baixos limites aceitáveis da UE.

4.5 Conclusão

Os dados demonstraram que os níveis de AFLs em castanha-do-Brasil variaram nas safras avaliadas e as amostras de 2007 apresentaram menor número de amostras contaminadas do que as de 2006, assim como para os níveis de Afls detectados. Ainda assim, as amostras positivas para AFLs, apresentaram na maioria, níveis de acordo com as legislações vigentes, inclusive com a européia, e a castanha-do-Brasil descascada, embalada a vácuo, apresentou muito menos ou quase nenhuma contaminação por AFL (LQ= 0,390) com apenas algumas amostras não-conformes com a legislação, em relação às amostras *com casca* nas duas safras. A aplicação do método de LC-MS/MS para quantificação das AFLs foi excelente e útil para atender aos limites da legislação internacional. Os dados encontrados permitem esclarecer as especulações sobre que tipo de castanha processada seria mais segura (*com casca* ou *descascada*): considerar a castanha-do-Brasil *descascada* embalada a vácuo, mais segura para comercialização/importação/exportação do que a *com casca*.

Uma das soluções para reduzir a deterioração do produto e contaminação por AFLs em castanha-do-Brasil com casca processada, além das seleções manuais no processamento, poderia ser o desenvolvimento de um equipamento selecionador capaz de detectar e rejeitar a deterioração na parte interna da castanha mesmo com a presença da casca, já que essa deterioração não é visível na seleção manual, conforme testado por de Mello e Scussel (2007). Por sua vez, em caráter preventivo na floresta, é importante fornecer suporte técnico, treinamento e principalmente incentivo aos extrativistas que coletam a castanha-do-Brasil para manter a segurança, e promover a qualidade até a chegada na usina para beneficiamento. Ações como estas citadas poderiam ajudá-los a manter sua fonte de renda e combater a degradação da floresta em busca de outras culturas agrícolas. Na usina, é necessário manter as condições ambientais controladas e se possível com refrigeração do produto acabado com apoio laboratorial para testes de AFLs, teor de umidade de monitoramento microbiológico.

4.6 Referências

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th, Horwitz, W. and Latimer, G. W. Jr. eds. Gaithersburg, Maryland, USA.
- Arrus, K., Blank, G., Clear, R. e Holley, R.A., 2005a. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, 41:513-527.
- Arrus, K., Blank, G., Clear, R., Holley, R.A. e Abramson, D., 2005b. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *Journal of food protection*, 68(5):1060-1065.
- Brazil. Ministry of Agriculture. 1998. Especifications for Brazil nut standardization, classification and internal commercialization. Brasília/DF: v.08, nº19, Dez. 1998.
- Brazil. Ministry of Agriculture. 2004. Monitoring and quality safety of brazil nut and brazil nut chain. Brasília, Section IN 13, 27/04/2004. DOU 28/05/2004. Section 1, p.24.
- Caldas, E. Silva, S.C. e Oliveira, J.N. 2002. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. *Rev. S. Publica*. 36:319-323.
- Castrillon, A.L. e Purchio, A., 1988. Contaminating fungi producing aflatoxins in Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl 1808). *Acta Amazonica* 18: 173-183.
- Chang, J.C. e Gutenmann, W.H., Reid, C.M. and Lisk, D.J., 1995. Selenium level of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. *Chemosphere* 30: 801-802.
- Chunhieng, T., Petritis, K., Elfakir, C.; Brocher, J.; Goll, T. e Montet, D., 2004. Study of selenium in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 4318-4322.
- de Mello-Robert. F., Scussel, V.M., 2006. External and internal characteristics of in-shell brazil nuts and their relation to aflatoxin contamination analyzed by LC-MS/MS. *Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection*. 165-171.
- Codex Alimentarius. 2006. Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts CAC/RCP 59-2005, Rev. 1-2006.
- de Mello-Robert. F., Scussel, V.M., 2007. Development of physical methods for mechanically in-shell Brazil nuts sorting. *XIIth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Oral Presentation*. OP1310.

- Dumont, E., De Pauw, L., Vanhaecke, F. and Cornelis, R., 2006. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): a hard nut to crack? *Food chemistry* 95: 684-692.
- EC - Commission of the European Communities (Health and Consumer Protection Directorate-General), 2003. Final report of a mission carried out in Brazil from 27th January to 7th February 2003 to assess the facilities and measures in place for the control of aflatoxin levels in Brazil nuts intended for export into the European Union, DG(SANCO)/9027/2003 – MR – final. 20 pp.
- EU - European Union, 1998 a. Commission Regulation 1525/98 of 16 July 1998, amending Regulation (EC) N. 194/97 of January 1997 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. *Official Journal of European Communities*.
- EU - European Union, 1998 b. Commission Directive 98/53/EC of 16 July 1998, laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuff. *Offic. J. of Europ. Communities*. 17.7.98, L 201/93.
- Freire, F.C.O.; Kozakiewicz, Z. e Paterson, R.M., 2000. Mycoflora and mycotoxins in brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 149:13-19.
- Marklinder, I.; Linblad, M.; Gidlund, A. e Olsen, M. 2005. Consumer's ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. *Food Additives and Contaminants*, 22:56-64.
- Montgomery, D., 2001. *Design and Analysis of experiments*. New York: John Wiley & Sons, 179p.
- Olsen, M. 2007. Personal information. XII International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxins. Istanbul, Turkey. May 21 a 25. IUPAC Programme Book, p4.
- Pacheco, A.M. e Scussel, V.M., 2006a. Brazil Nut: From Tropical Forest to Consumer. Editograf, Editograf. Florianopolis, SC, Brazil, 173p.
- Pacheco, A.M. e Scussel, V.M., 2006b. Effects of processing and factory storage on aflatoxin contamination of in-shell Brazil nuts. *Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection*, pp.159-164.
- Pitt, J.I. e Hocking, A.D. 1985. *Fungi and Food Spoilage*. Academy Press, Sydney.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R. e O'Brien, N.M. 2006. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of Brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *International journal of food sciences and nutrition*.57:219:228.
- Scussel, V.M., 2004. Aflatoxin and food safety: Recent South American Perspectives. *Journal of Toxicology. Toxin Reviews*, 23:179-216.
- Simsek, O.; Arici, M. e Demir, C., 2002. Mycoflora of hazelnut (*Corylus avellana* L.) and aflatoxin content in hazelnut kernels artificially infected with *Aspergillus parasiticus*. *Nahrung/Food* 46(3):194-196.
- Steiner, W.E., Brunschweiler, K., Leimbacher, E. e Schneider, R., 1992. Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and Pistachio nuts. *J. of Agric. and Food Chemistry* 40: 2453-2457.
- Xavier, J.J. e Scussel V.M., 2007. Development of methodology by LC-MS/MS for aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in Brazil nuts for export. *International Journal of Environmental Chemistry*. In press.
- Zolnner, P. e Mayer-Helm, B., 2006. Trace mycotoxins analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1136: 123-169.

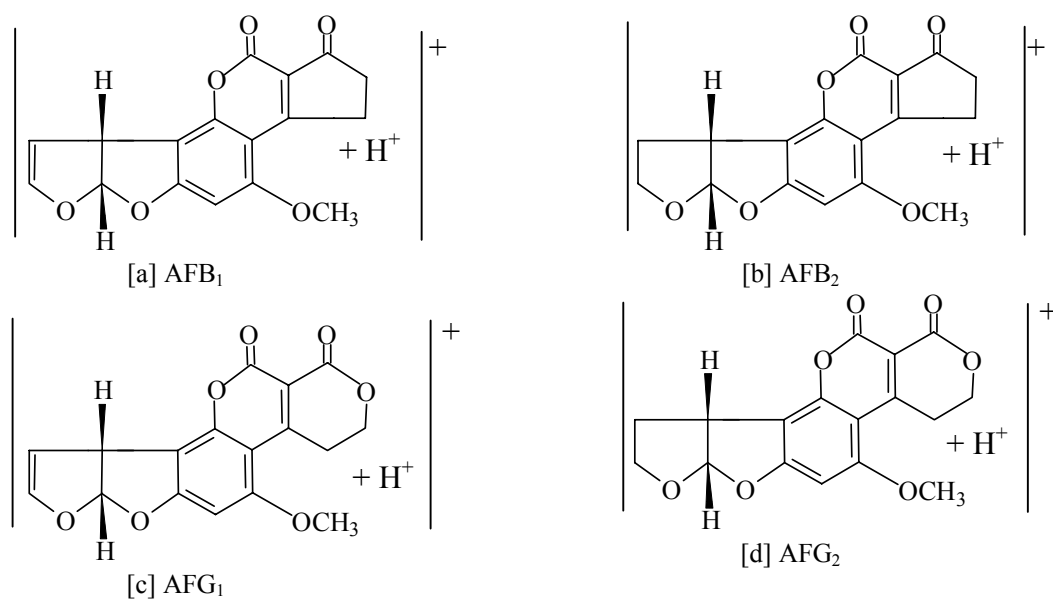


Figura 1. Estrutura molecular dos ions protonados das aflatoxinas $[M+H]^+$ em [a] m/z 313.1, [b] m/z 315.0, [c] m/z 329.1 e [d] m/z 331 para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, respectivamente

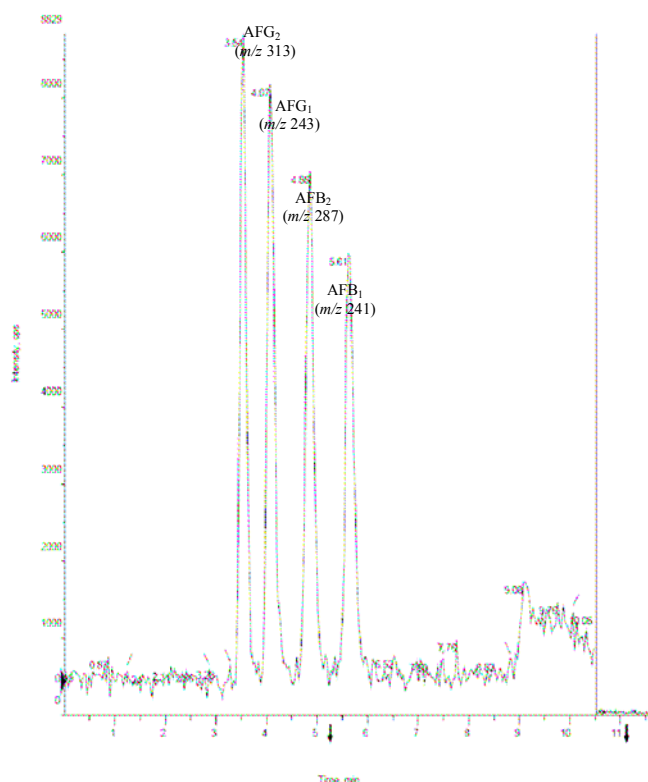


Figura 2 Cromatograma Ion mass de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ em amostras de castanha-do-Brasil naturalmente contaminada, utilizando LC-MS/MS – APCI $[M+H]^+$ Coluna: fase reversa C₈. Fluxo na proporção de: 1 ml/min. MP: MeOH:H₂O com 25 mM de acetato de amônio.

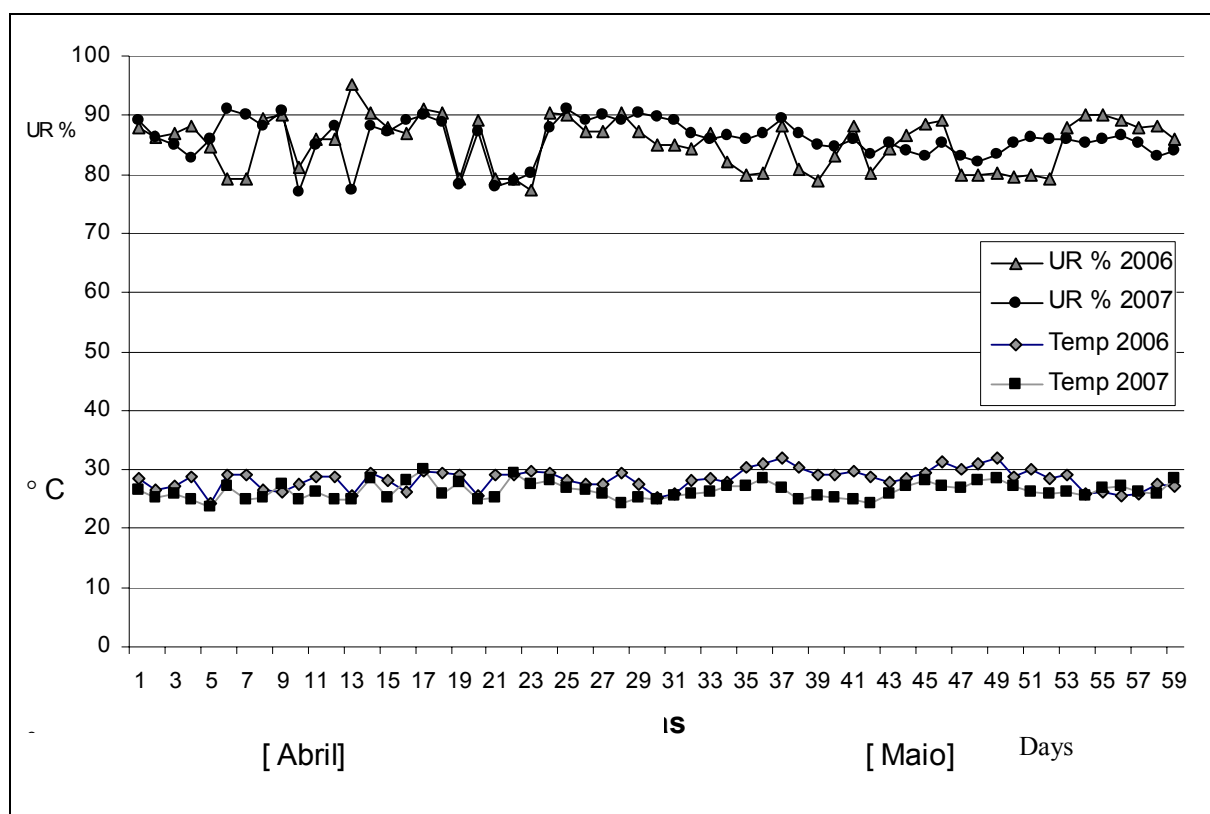


Figura 3. Condições ambientais em usina de castanha-do-Brasil de Abril a Maio de 2006 e 2007 [UR %] Umidade relativa; [°C] temperatura.

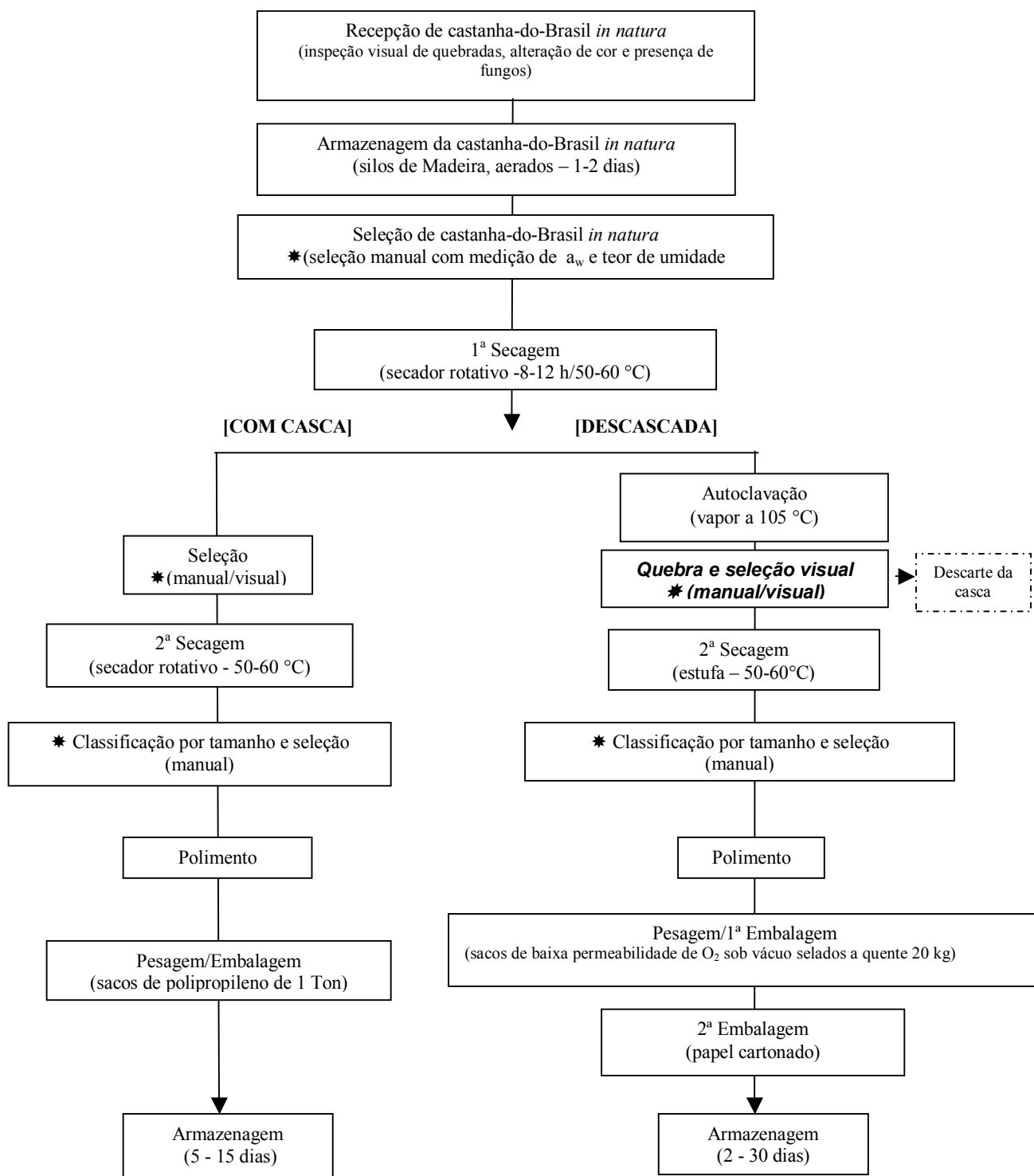


Figura 4 Fluxograma de processamento da castanha-do-Brasil seca, com casca e descascada, com as [*] etapas de seleção

Tabela 1. Níveis de Aflatoxinas em castanha-do-Brasil processada com casca e descascada tipo exportação das safras de 2006 e 2007, analisadas por LC MS/MS- APCI

Castanha-do-Brasil processada				Níveis de AFL ^a (ng.g ⁻¹)					
Safr Tipo	Tamanho	Total ^c	Total de amostras positivas ^d <div>>4^e >15^f</div>	Σ AFLs (faixa) ^g	Média±DP ^b				
					AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	
2006									
Com casca ^h	Large	18	0	2,7 ⁱ ± 1,3 (1,9-3,9)	1,5±0,6	0,2±0,3	1,0±0,7	ND	
	Medium	18	2	145,2 e 865,0 ^k	61,4±9,5*	ND	50,8±7,9	ND	
	Small	27	7	26,0 ± 6,0 (3,9-379,0) ^{m**}	10,9±1,3**	6,7±1,2	5,8±3,3	2,3±0,2	
	Total	63	9	4					
Descascada ^j	Large ^l	15	0	0,9 ± 0,9 (1,2-3,3)	0,3±0,3	ND	0,3±0,3	0,2±0,2	
	Medium ^l	15	1	2,2 ± 1,4 (2,6-11,2) ^l	0,8±0,5	ND	0,7±0,4	0,4±0,2	
	Small	15	0	1,5 ± 0,5 (0,9-3,27) ^m	0,6±0,2	ND	0,5±0,2	0,3±0,2	
	Total	45	1	0					
Total geral		108							
2007									
Com casca	Large ^l	12	0	0,7 ±0,6 (1,6-3,2)	0,3±0,3	0,2±0,2	0,4±0,4	ND	
	Medium	12	1	1,3 ±1,0(3,1-5,6) ^l	0,6±0,6	0,3±0,2	0,5±0,5	0,1±0,1	
	Small	12	1	1,8 ±1,8 (1,6-6,0)	0,7±0,6	0,4±0,4	0,6±0,5	0,1±0,1	
	Total	36	2	0					
Descascada	Large	9	0	0,7 ±0,97 (1,4-2,8)	0,3±0,3	0,1±0,1	0,3±0,3	ND	
	Medium	9	2	2,1 ± 2,0 (1,5-7,4) ^l	1,0±0,9	0,4±0,4	0,4±0,4	0,2±0,1	
	Small	9	0	0,6± 0,6 (1,4-3,5)	0,3±0,3	0,2±0,2	0,2±0,2	ND	
	Total	27	2	0					
Total geral		63							

^a aflatoxinas ^b desvio padrão calculado do total de amostras ^c quantidade mínima analisada por amostra: com casca: 12 kg e descascada: 6 kg

^d LD e LQ do Método LC-MS/MS para ΣAFL = 0,195 e 0,390 ng.g⁻¹, respectivamente.

^e amostras acima do limite máximo aceitáveis pela legislação europeia de ΣAFL = 4,0 ng.g⁻¹ ^f amostras acima dos limites máximos aceitáveis do Canadá. EUA e Mercosul da ΣAFL =

15,0 ng.g⁻¹

^g AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂, resultado expresso como ng.g⁻¹.

^h castanhas inteiras foram descascadas e aquelas visualmente deterioradas foram incluídas e trituradas e submetidas à análise de AFL ⁱ média ± desvio padrão

^j castanhas descascadas foram coletadas após passar pela última etapa de seleção (mesas) e prontas para embalagem a vácuo e embarcadas.

^{l, m} valores que apresentaram diferença significativa em nível de 5 %

* duas amostras positivas – estavam deterioradas e incluídas na preparação da amostras laboratorial ** amostras positivas - estavam deterioradas e incluídas na preparação da amostras laboratorial

Tabela 2. Teor de umidade e atividade de água em castanha processada com casca e descascada tipo exportação das safras de 2006 e 2007

Amostras		Teor de Umidade ^a (%)				a _w ^b		
Safra Tipo	Tamanho ^c	Total	Faixa	Média	DP ^d	Faixa	Média	DP
2006								
Com casca	Large	18	8,0 – 10,0	8,7	0,7	0,55 – 0,66	0,61	0,05
	Medium	18	7,1 – 10,2	8,5	1,0	0,54 – 0,64	0,60	0,04
	Small	27	5,0 -9,8	7,2	0,9	0,53 – 0,67	0,61	0,03
	Total	63		8,1			0,61	
Descascada	Large	15	1,6 – 2,9	2,2	0,3	0,59 – 0,66	0,63	0,02
	Medium	15	1,7 – 2,7	2,1	0,3	0,60 – 0,64	0,61	0,01
	Small	15	1,8 – 2,8	2,2	0,3	0,60 – 0,62	0,61	0,01
	Total	45		2,1			0,62	
2007								
Com casca	Large	12	7,2 – 12,0	8,4	0,9	0,58 -0,69	0,62	0,02
	Medium	12	7,0 -9,1	8,0	0,6	0,58 – 0,69	0,63	0,05
	Small	12	6,8 – 8,0	7,3	0,3	0,57 – 0,63	0,60	0,02
	Total	36		7,9			0,62	
Descascada	Large	9	1,8 – 3,0	2,5	0,4	0,58 – 0,68	0,62	0,02
	Medium	9	1,9 – 2,6	2,1	0,1	0,52 – 0,68	0,60	0,03
	Small	9	1,9 – 2,6	2,3	0,2	0,60 – 0,62	0,61	0,01
	Total	27		2,3			0,61	

^a teor de umidade %

^b atividade de água

^c total de amostras analisadas com casca: 12 kg e descascada: 6 kg

^d desvio padrão

5 ARTIGO

AFLATOXINAS E OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRODUTOS COM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* HBK)

Trabalho submetido à publicação na revista: Ciência e Tecnologia de Alimentos

AFLATOXINAS E OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRODUTOS COM CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa* HBK)

5.1 Resumo

Resumo

A castanha-do-Brasil é um importante ingrediente para a indústria de alimentos devido ao elevado teor nutricional. Para identificar alguma relação entre o teor de aflatoxinas (AFLs) e a oxidação de produtos com castanha-do-Brasil, cinquenta amostras do varejo (castanha com chocolate (14), *descascada* (14), cereais matinais (9) e biscoitos(13)) foram avaliadas imediatamente após a aquisição (T0) e após o prazo de validade (TF). O método para AFLs foi LC-MS/MS (LOQ de Σ AFLs ($B_1+B_2+G_1+G_2$)= 0,390 ng.g⁻¹) e para oxidação, espectrofotometria UV para dienos e trienos conjugados. Ao considerar as AFLs, 56 % das amostras obedeceram aos limites da União Européia de 4 ng.g⁻¹ para Σ AFLs e o maior teor foi em castanha com chocolate com média de 4,34 ng.g⁻¹ (0,10-8,50 ng.g⁻¹) Σ AFLs, seguido de castanha *descascada* com média de 4,31 ng.g⁻¹ (0,25-8,78 ng.g⁻¹) Σ AFLs. Ao avaliar os produtos ao final do prazo de validade, foi observada diferença significativa em relação ao momento da aquisição, quanto a AFLs para *snacks* e biscoitos, mas não para os demais produtos. O maior teor de dienos conjugados foi observado em *descascada* (232nm/T0=0,7450 e 232nm/TF=1,3336). A presença de oxidação e AFLs pode ser explicada pela origem/armazenagem de ingredientes previamente contaminados e/ou pela baixa qualidade de algumas embalagens que não tem propriedades contra ação da luz e do O₂. É importante enfatizar a necessidade de monitoramento da castanha-do-Brasil e derivados, e maior critério na seleção dos ingredientes e desenvolvimento de mecanismos para evitar a oxidação lipídica.

Palavras-Chaves: espectrofotometria, LC MS/MS, dienos conjugados, trienos conjugados, castanha-do-Brasil, aflatoxina, oxidação

Abstract

Despite of the increase in the last years of nuts as ingredient in food industry, data of the Aflatoxin (AFLs) contamination in nut products are scarce. Brazil nut is an ingredient in the food industry due to the high nutritional content and in order to identify any relation between AFLs and oxidation in Brazil nut products a work was carried out in fifty samples, analyzed after purchased and at the end of shelf life. The LC MS/MS was used to analyze AFL (LOQ for Σ AFLs (B1+B2+G1+G2) of $0.390 \mu\text{g.kg}^{-1}$) and the spectrophotometry to conjugated dienes and trienes. Regarding AFLs, 56% of the samples were according the European Union limits of $4 \mu\text{g/Kg}$ of for AFLs. The highest Σ AFLs results was observed in candies, mean of $4.34 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (0.10 to $8.50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) followed by shelled nuts, mean of $4.31 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (0.25 to $8.78 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Concerning the time of analysis there was statistical significant to AFLs to shelled nuts and cookies, but not to the other products. The highest conjugated dienes was observed in shelled nuts ($232\text{nm}/0=0.7450$ and $232\text{nm}/\text{Final}=1.3336$). To explain the AFL presence and oxidation, the origin/storage of previously contaminated ingredients and the poor quality of packs, were considered factors. In conclusion it is important to emphasize the necessity of AFL surveillance in Brazil nut products and the improvement of packing mechanisms to avoid lipid oxidation, as well as criteria to select safe ingredients, especially Brazil nuts.

Key Words: spectrophotometry, LC MS/MS, dienes, trienes, Brazil nut, Aflatoxin

5.2 Introdução

Apesar de as nozes de árvores serem alimentos tipicamente ricos em gordura, estas têm sido recomendadas em dietas balanceadas para promover a saúde em humanos, com efeito, cardio e imuno protetor (Chisholm et al., 2005, Kocyigit et al., 2006). Como exemplo, a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), produto do extrativismo na região Amazônica, é um alimento muito útil a por apresentar correlação positiva com suplementação de grupos de indivíduos e promoção da saúde (Coutinho et al., 2002). Além do elevado teor de lipídios o caráter nutricional da castanha-do-Brasil inclui proteínas e antioxidantes, como os tocoferóis e Selênio (Se) (Chuninheng et al., 2004; Ramos e Bora, 2005) caracterizando-a como excelente ingrediente para enriquecer produtos industrializados (Souza e Menezes, 2004). O conteúdo total de óleo em

castanha-do-Brasil pode atingir níveis de 60-70% (Andrade et al., 1999; Kornsteiner et al., 2006; Venkatasalam et al., 2006), entretanto o perfil lipídico torna o alimento, bastante susceptível a oxidação devido a quantidade de ácidos graxos insaturados que atinge acima de 73 % (como oléico e linoléico), maior que em outras nozes (Rodrigues et al., 2005).

Os ácidos graxos insaturados, por sua vez, são considerados como uma das maiores causas de danos nas propriedades sensoriais de alimentos, bem como de produção de compostos que podem afetar as propriedades nutricionais dos alimentos. A partir dos ácidos graxos insaturados, podem ser formados hidroperóxidos, pois os lipídios apresentam uma mudança/rearranjo na dupla ligação, durante o processo de oxidação, dos quais os Dienos Conjugados (DC) são produtos típicos, exibidos com intensa absorbância em 232 nm. De forma similar, os Trienos Conjugados (TC) também são compostos resultantes do rearranjo das ligações, com absorbância em 270 nm. Teoricamente, o aumento da absorbância em UV na faixa de 232 e 270 nm reflete a formação de compostos nos estágios iniciais da oxidação de óleos e gorduras, e medir o teor de DC e TC é um bom parâmetro para determinar a instabilidade oxidativa de óleos, pois o aumento do teor dos compostos é proporcional a incorporação de O₂, e quanto maior o teor de DC e TC, menor a instabilidade oxidativa (Farmer e Sutton, 1946; Shahidi & Wanasundara, 1997; Chatha et al., 2006).

A qualidade do óleo, portanto, é diretamente dependente da conservação da castanha-do-Brasil, entretanto alguns fatores ambientais da cadeia-produtiva podem afetar a qualidade, como por exemplo: alta temperatura ambiente (>30 °C), umidade relativa (UR %) >70 % e condições sanitárias de armazenamento/manejo insatisfatórias e/ou que elevem o teor de atividade de água (a_w) acima de 0.70 e causem deterioração (Campo/Pas, 2004; Codex Alimentarius, 2006). Tais fatores podem influenciar o metabolismo de fungos em contato com a castanha-do-Brasil (Bayman et al., 2002; Arrus et al., 2005a) levando a possibilidade de produção de Aflatoxinas (AFLs) em castanha-do-Brasil (Castrillon e Purchio, 1988; Steiner et al., 1992; Arrus et al, 2005b; Pacheco e Scussel 2006), pois são compostos naturalmente hepatotóxicos e carcinogênicos (IARC, 1997; PITT, 2006). A presença de AFLs, associada à diminuição da produção em algumas áreas extrativistas, têm afetado as exportações brasileiras

devido aos limites mais exigentes de importadores, como países da União Europeia (UE) de 4 ng.g^{-1} para ΣAFLs (EU, 1998), e, de forma a buscar novos mercados, a castanha-do-Brasil processada, com e sem casca, tem sido comercializada como ingrediente para indústrias de alimentos na obtenção de novos produtos. Devido a necessidade de estudar os derivados da castanha-do-Brasil (castanha com chocolate, descascada, cereais e biscoitos) obtidos no varejo, quanto aos parâmetros de instabilidade oxidativa e ocorrência de AFLs, um trabalho foi conduzido, para avaliar a associação entre esses fatores.

5.3 Material e Métodos

Material

Amostragem: cinquenta amostras (em duplicata), de embalagens originais de diferentes lotes de derivados de castanha-do-Brasil (castanha com chocolate, descascada, cereais matinais e biscoitos) foram coletados aleatoriamente, em supermercados das cidades de Manaus-AM e Florianópolis-SC, de Fevereiro a Março de 2006 (Tabela 1). As marcas comerciais de cada produto e os estabelecimentos comerciais foram semelhantes durante todo o período de coleta.

Reagentes: ciclohexano, acetonitrila, metanol (HPLC), Carlo Erba. Acetato de Amônio Vetec. Água Ultrapura (mili-Q, Millipore). Padrões de AFLs: AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2, Sigma.

Equipamentos e Utensílios: cromatógrafo líquido 1100, detector mass/mass Agilent; API 4000, Applied Biosystems MDS SCIEX e coluna C8 (45 mm, 150 mm, 5 μm) Hichrom; espectrofotômetro, Femto; Balança analítica. Para coleta e preparo da amostra: descascador industrial, CIEX; Moinho industrial, Caf; tesouras e sacos plásticos (1-5 kg).

Métodos

Armazenagem: as amostras adquiridas em duplicata foram separadas para análise em: (a) imediatamente após a aquisição ($T=0$) e (b) mantidas em temperatura média de $28,5^\circ\text{C}$ e analisadas ao final do prazo de validade dos produtos ($T=F$), conforme especificados nos rótulos (em dias) de: 90 dias (castanha com chocolate), 180 dias (descascada), 180 dias (cereais matinais) e 60 dias (biscoitos). *DC* e *TC*: foram determinados por espectrofotometria UV com determinação da absorbância em 232 nm

(DC) e 270 nm (TC) conforme IUPAC (1979). *AFLs*: foi utilizado o método de LC-MS/MS-APCI (Xavier e Scussel, 2007), com coluna C8, fluxo na proporção de 1 ml/min, e fase móvel de metanol:água (5 min), com Limite de quantificação (LQ) de $\Sigma\text{AFLs} = 0,390 \text{ ng.g}^{-1}$.

Análise estatística: a correlação das variáveis foi determinada, pela significância estatística para *AFLs* pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (nível 5 %) e para DC e TC pelo teste de Pearson (Montgomery, 2001).

5.4 Resultados e Discussão

A avaliação da qualidade de produtos requer métodos cada vez mais rápidos e sensíveis e para avaliar a oxidação, a espectrofotometria foi boa alternativa, com evidente diferença entre os tempos de armazenamento dos produtos, assim com o método de LC MS/MS na detecção de níveis muito baixos ($<4 \text{ ng.g}^{-1} \Sigma\text{AFLs}$) em alguns produtos avaliados.

Para a oxidação lipídica, as variáveis foram consideradas conforme absorbâncias específicas de 232 nm e 270 nm/tempo. Para cada uma, a análise de variância foi utilizada usando o modelo não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) e não indicou diferença significativa apenas entre os produtos em *270/TF* com $p = 0,0530$ (Tabela 2). As maiores médias em *232/T0* e *232/TF* foram observadas para castanha-do-Brasil descascada, com diferença significativa de 0,7450 e 1,3336, respectivamente. Entretanto, nos dois tempos analisados a menor média foi para cereais. Em *270/T0* a maior média foi observada para *snacks*, mas não apresentou diferença para castanha com chocolate ou biscoitos. Contudo, estes dois últimos, não apresentaram diferença significativa entre si. Ao final do prazo de validade (*270/TF*) as amostras de cereal apresentaram a maior média e diferença significativa em relação aos demais produtos, que foram similares entre si. Por outro lado, a menor média ao final do armazenamento foi observada em biscoitos (0,1255).

Para análise da variância de *AFLs* nos produtos avaliados, no teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), não foi observada significância estatística ao comparar os produtos ($p = 0,7370$). Apesar disso, o maior teor de ΣAFLs foi observado em castanha com chocolate com média de $4,34 \text{ ng.g}^{-1}$ (0,10-8,50 ng.g^{-1}), seguida de castanha descascada com média de $4,31 \text{ ng.g}^{-1}$ (0,25-8,78 ng.g^{-1}). Comparando os resultados,

obtidos com o limite de $<4 \text{ ng.g}^{-1} \Sigma\text{AFLs}$, os biscoitos apresentaram menor número de amostras positivas (693 ,%), entretanto, 50 % das castanhas com chocolate e tipo snacks estavam acima do limite máximo da legislação internacional, sem diferença ($p>0,05$), entre os produtos estudados. Apesar das amostras positivas, nenhum dos produtos estava acima dos limites de AFLs para castanha-do-Brasil nos Estados Unidos, Canadá ou Mercosul ($10, 15 \text{ e } 20 \text{ ng.g}^{-1}$). Considerando a associação entre a deterioração por DC e TC com a ocorrência de AFLs, pelo teste de Pearson, foi observada estatística significativa ($p<0,05$), para castanha descascada nos dois tempos de análise (T0 e TF) e para biscoitos, apenas em TF. Para os demais produtos não foi observada estatística significativa entre AFLs e oxidação lipídica.

A ausência de significância estatística entre as variáveis AFLs e oxidação por DC/TCT, poderia ser explicada, principalmente pelo uso de outros ingredientes além da castanha-do-Brasil, como o trigo, outras frutas secas presentes no cereal e/ou com elevado teor de lipídios oxidáveis, como o chocolate e gorduras. Pedacinhos de castanha-do-Brasil, por sua vez, poderiam ter sido contaminados antes do processo de industrialização dos produtos, pois em pesquisas, realizadas anteriormente as AFLs foram detectadas em castanhas *in natura* e processadas (Scussel, 2004; Pacheco e Scussel, 2007). Além da amostra *descascada*, nenhuma das demais, apresentava a quantidade de castanha-do-Brasil utilizada nas formulações, de forma a relacionar essa informação com os resultados encontrados. Apesar desse fato, é importante ressaltar que no beneficiamento, há diversas etapas de seleção de castanhas deterioradas visualmente, bem como monitoramento para detecção de lotes contaminados, assim como o consumidor, no caso de castanhas do tipo *snacks*, pode ter habilidade de segregar visualmente castanhas deterioradas e que possam estar contaminadas com AFLs (Marklinder et al., 2005). A influência do binômio tempo/condições de armazenagem, associada à embalagem com baixa capacidade de proteção ao produto afeta negativamente a qualidade de produtos derivados da castanha-do-Brasil (Souza e Menezes, 2006). O número de amostras positivas pode ser justificado pela sensibilidade do método de LC-MS/MS ser elevada, mesmo em matrizes complexas com alto teor de proteínas e lipídios.

O uso de DC e TC como parâmetros para avaliar a oxidação demonstrou ser um mecanismo favorável para produtos com óleo de castanha-do-Brasil, assim como para outros tipos de óleo, como, por exemplo, o óleo de girassol, que teve sua instabilidade testada, com a atividade antioxidante de extrato de alho em condições controladas (Iqbal e Bhanger, 2007). Os resultados encontrados para a oxidação lipídica de TC no tempo final de armazenamento corroboram com os resultados obtidos em outro trabalho com castanha-do-Brasil com casca armazenada, em que a temperatura ambiente era mantida acima de 2°C (Ribeiro et al., 1993). Os altos níveis de deterioração oxidativa em castanha descascada podem ser explicados pela presença dos ácidos graxos polinsaturados (> 75 %) associados à baixa qualidade das embalagens das amostras, normalmente filme plástico, e que permitiram que a instabilidade dos produtos fosse afetada, já que a autooxidação de ácidos graxos insaturados em alimentos envolve a formação de radicais livres por meio da reação catalizada por calor, luz, elementos traço, ou enzimas (Vieira e Regitano-D'Arce, 1999; Zuta et al., 2007). Tais fatores estão presentes no processo industrial de obtenção de produtos da castanha-do-Brasil e precisam ser controlados para não afetar a composição nutricional. Apesar dos danos que ocorrem durante o processamento à integridade da amêndoa da castanha, a presença da casca em etapas anteriores da cadeia produtiva, pode ser considerada como fator adicional de proteção contra a oxidação, assim como a manutenção de $a_w < 0,70$, teor de umidade <15 % (Brasil, 2004) e a ação de outros antioxidantes naturalmente presentes, de forma a associar esses fatores e aumentar a instabilidade dos produtos, sem a adição de aditivos artificiais (Prado-Filho, 1994).

5.5 Conclusão

O monitoramento de produtos de castanha-do-Brasil é necessário devido ao aumento da popularidade e variedade desses produtos com alto teor nutricional, de forma a encontrar mecanismos para ampliar a vida-de-prateleira e fornecer incentivo para que mecanismos de segurança sejam aplicados em toda a cadeia produtiva. O método de LC-MS/MS foi altamente sensível na avaliação de AFLs nos produtos e permitiu que os teores detectados fossem suficientemente baixos para atender o limite de $< 4 \text{ ng.g}^{-1}$. Apesar de não haver significância estatística entre AFLs e oxidação lipídica nos produtos é importante enfatizar a necessidade de aplicação de controles na qualidade

nas cadeias produtivas de cada um dos ingredientes dos produtos. Para a cadeia produtiva de castanha-do-Brasil, o controle de AFLs permitirá maiores possibilidades comerciais com valorização dos produtos da floresta e expectativas tanto no beneficiamento, quanto na atividade.

5.6 Referências

- Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S., Streich, R. e Marx, F. Seed composition of Amazonian Lecythidaceae Species: Part 3 in the Series "Studies of Edible Amazonian Plants". **Journal of food composition and analysis** 12:37-51. 1999
- Arrus, K., Blank, G., Clear, R., Holley, R.A. e Abramson, D. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. **Journal of food protection**, 68(5), 1060-1065. 2005a
- Arrus, K., Blank, G., Clear, R. e Holley, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, 41, 513-527. 2005b
- Bayman, P, Baker, J.L. e Mahony, N.E. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. **Mycopathologia**, 155, 161-169. 2002.
- Brazil (2004). Ministry of Agriculture. Monitoring and quality safety of brazil nut and brazil nut chain. Brasilia, Section IN 13, 27/04/2004. **DOU** 28/05/2004. Section 1, p.24. 2004.
- CAMPO/PAS. Manual de Segurança e Qualidade para a Cultura da castanha do Brasil. Série Qualidade e Segurança dos Alimentos. Brasília,DF: Campo PAS, 2004.
- Castrillon, A.L. e Purchio, A. Contaminating fungi producing aflatoxins in Brazil nuts (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl 1808). **Acta Amazonica** 18: 173-183. 1988.
- Chang, J.C., Gutenmann, W.H., Reid, C.M. & Lisk, D.J. Selenium level of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. **Chemosphere**, 30: 801-802. 1995.
- Chatha, S. A. S, Hussain, A.I., Bajwa, J. e Sagir, M. Antioxidant activity of different solvent extracts of rice bran at accelerated storage of sunflower oil. **Journal of Food Lipids**, 13, 424–433. 2006.
- Chisholm, A., Auley, K. Mc., Mann, J., Williams, S., e Skeaff, M. Cholesterol lowering effects of nuts compared with a Canola oil enriched cereal of similar fat composition. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases** 15:284-292. 2005
- Chunhieng, T., Petritis, K., Elfakir, C.; Brocher, J.; Goll, T. e Montet, D. Study of selenium in the protein fractions of the Brazil nut, *Bertholletia excelsa*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 52: 4318-4322. 2004.
- Codex Alimentarius. **Code of practice for the prevention and reduction of aflatoxin contamination in tree nuts** CAC/RCP 59-2005, Rev. 1-2006. 2006.
- Coutinho, V.F., Bittencourt, V.B. e Cozzolino, S.M.F. Effects of supplementation with Brazil nuts (CP, *Bertholletia excelsa* H.B.K.), In capoeira players on selenium (Se) concentration and glutathione peroxidases activity (GSH-PX, E.C.1.11.1.9). In: **Trace elements in man and animal**. Springer, Part II, Subpart V. 2002
- EU- European Union. Commission Decision of 4 July 2003, imposing special conditions on the import of Brazil nuts in shell originating in or consigned from Brazil (2003/493/EC). **Official Journal of the European Union**. 5.7.2003, L 168/33. 2003.
- EU - European Union. Commission Regulation 1525/98 of 16 July 1998, Amending Regulation (EC) N. 194/97 of January 1997. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. **Official Journal of European Communities**. 1998.
- Farmer E.H. e Sutton D. A. Peroxidation in relation to olefinic structure, Transactions of Faraday Society 42 (1946), pp. 228–232. 1948.
- IARC. International Agency of Research on Cancer. Evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: aromatic amines and mycotoxins. Lyon.. **IARC Monographs**, 56. p. 245-39, 1997.

- Iqbal, S. e Bhanger, M.I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food chemistry**, 100:246-254. 2007.
- IUPAC- International Union of Pure and Applied Chemistry. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. In C. Paquot (Ed.), IUPAC method II. D. 23 (6th ed.). Oxford, England: Pergamon Press. 1979.
- Kocyigit, A., Koylu, A.A. e Keles, H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, 16, 202-209. 2006.
- Kornsteiner, M., Wagner, K. e Elmadfa, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, 98, 381-387. 2006.
- Marklinder, I.; Linblad, M.; Gidlund, A. e Olsen, M. Consumer's ability to discriminate aflatoxin-contaminated Brazil nuts. **Food Additives and Contaminants**, 22, 56-64. 2005.
- Montgomery, D. **Design and Analysis of experiments**. New York: John Wiley & Sons, 179 p. 2001.
- Pacheco, A.M. e Scussel, V.M. Selenium and Aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the eastern and western Amazon Basin, **Journal of Agric. and food chemistry**, In press. 2007
- Pacheco, A.M. and Scussel, V.M. Castanha do Brasil: da floresta tropical ao consumidor. Editograf, Editograf. Florianópolis, SC, Brazil, 173p. 2006.
- Pitt, J.I. Fungal ecology and the occurrence of mycotoxins. In: **Mycotoxins and Phycotoxins-Advances in determination, toxicology and exposure management**, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, p.33-41. 2006.
- Prado-Filho, L.G. () Umidade relativa de equilibrio e oxidação de lipídios em farinhas de castanha-do-pará, de macadâmia e de soja. **Scientia agricola**, 51 (2):357-362, maio/ago. 1994.
- Ramos, C.M.P. e Bora, P.S. Functionality of succinylated Brazil nut (*Bertholletia excelsa* HBK) Kernel globulin. **Plant food for human nutrition**, 60:1-6. 2005.
- Ribeiro, M.A.A.; Regitano-Darce, M.A.B.; Lima, U.A. e Baggio, C.E. Whole and shelled Brazil nut storage: effect of the temperature on their resistance to rancidity. **Scientia Agrícola**, v.50, n.3, Piracicaba, Out/Dez. 1993.
- Rodrigues, C. E.C., Silva, F.A., Marsaioli Jr., A. and Meirelles, A.J.A. Deacidification of Brazil Nut and Macadamia Nut Oils by Solvent Extraction: Liquid-Liquid Equilibrium Data at 298.2 K. **J. Chem. Eng. Data**, 50: 517-523. 2005.
- Scussel, V.M. Aflatoxin and food safety: Recent South American Perspectives. **Journal of Toxicology**. Toxin Reviews, 23:179-216. 2004.
- Shahidi, F. e Wanasundara, U.N.. Measurement of lipid oxidation and evaluation of antioxidant activity. In: F. Shahidi, Editor, **Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications**, AOCS Press Champaign, IL, USA (1997), pp. 1-10. 1997.
- Souza, M.L. e Menezes, H.C. Sensorial evaluation of matutinal cereals of the Brazil nut with extruded cassava. . **Cienc. Tecnol. Alimentos**. Campinas, 26 (4), 950-955. 2006.
- Souza, M.L. e Menezes, H.C. Processing of Brazil nut and meal and cassava flour:quality parameters. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(1): 120-128. 2004.
- Steiner, W.E., Brunschweiler, K., Leimbacher, E. e Schneider, R. Aflatoxins and fluorescence in Brazil nuts and Pistachio nuts. **J. of Agric. and Food Chemistry**, 40: 2453-2457. 1992.
- Venkatachalam, M. e Sathe, S.K. Chemical composition of selected edible nut seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**. 54: 4705-4714. 2006.
- Vieira, T.M.F.S. e Regitano-Darce, M.A.B. Antioxidant concentration effect on stability of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) crude oil. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49:271-274. 1999.
- Xavier, J.J.e Scussel V.M. Development of methodology by LC-MS/MS for aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in Brazil nuts for export. **Mycotoxin Research**. In press. 2007.
- Zuta, P.C., Simpson, B.K., Zhao, X. e Leclerc, L. The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. **Food Chemistry**, 100:800-807.

Tabela 1. Parâmetros de caracterização dos produtos de castanha-do-Brasil

Produtos			Caracterização		
Tipo	Ingredientes Básicos	Tipo de Embalagem	Vida-de-prateleira (dias)	Local de Coleta	Local de Produção
Biscoitos	Açúcar, trigo, manteiga, amido de milho e castanha-do-Brasil	Polietileno	60	Manaus (Am)	Manaus (Am)
Castanha c/ chocolate	Chocolate, pedaços de castanha, gordura hidrogenada	Polietileno	90	Florianópolis (SC)	Joinville (SC)
Cereal matinal	Milho, açúcar, sal, ácido ascórbico, aroma artificial de baunilha, uva passa, castanha-do-Brasil em pedaços	Polietileno / papel kraft	180	Florianópolis (SC)	Florianópolis (SC)
Descascada (inteira)	Castanha-do-Brasil sem casca	Polietileno	180	Manaus (AM)	Manaus (AM)

Tabela 2. Associação entre aflatoxinas e oxidação lipídica em produtos da castanha-do-Brasil comercializados no Brasil

Amostras	Teor de oxidação lipídica ^{1,2}						Níveis de AFL ³ (ng.g ⁻¹)		
	232 (DC)			270 (TC)					
	Total	T0	TF	T0	TF	Σ AFLs ⁵	Min	Max	>4,0 ⁶ (%)
Biscoitos	13	0,3491 ^a	0,5766 ^a	0,0673 ^a	0,1255 ^a	3,23 _a ± 1,41	0,16	7,48	9 (69,3)
Castanha c/ chocolate	14	0,2620 ^b	0,5089 ^a	0,0886 ^a	0,1618 ^a	4,34 _a ± 1,78	0,10	8,50	7 (50)
Cereal	9	0,1379 ^c	0,2488 ^b	0,0265 ^b	0,4987 ^b	4,28 _a ± 1,69	0,99	7,02	5 (55,6)
Descascada	14	0,7450 ^a	1,3336 ^a	0,0907 ^a	0,1703 ^a	4,31 _a ± 1,65	0,25	8,78	7 (50)
Total	50							28 (56)	22 (44)

¹ deterioração lipídica por espectrofotometria em diferentes absorvâncias/tempo: 232 nm T0 e 232 nm TF (DC); 270 nm T0 e 270 nm TF (TC).

² valor-p em: 232/T0=0,001; 232/TF: 0,0001; 270/ T0: 0,0499; 270/TF: 0,0530 (p>0,005)

³ AFL: AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂, resultados expressos em ng.g⁻¹

⁴ Σ AFLs: LQ= 0,39 ng.g⁻¹ ± RSD

⁵ Abaixo de 4,0 ng.g⁻¹ Σ AFLs (EU, 2003)

⁶ Acima de 4,0 ng.g⁻¹ Σ AFLs (EU, 2003)

^a médias na mesma coluna seguidas de letras distintas entre si possuem nível de significância de 5 %.

6 ARTIGO

SELENIUM EFFECT ON FUNGAL PROLIFERATION AND AFLATOXIN
PRODUCTION IN BRAZIL NUTS

**Trabalho submetido à publicação na revista: International Journal of Food
Microbiology**

Selenium Effect on Fungal Proliferation and Aflatoxin Production in Brazil Nuts

Pacheco, A.M. and Scussel, V.M. *

6.1 ABSTRACT

A study of the Se effect on fungi proliferation and toxin formation was carried out utilizing an aflatoxigenic reference *A. flavus* strain (FC 1167). The strain was inoculated on potato dextrose agar (PDA) containing Se as sodium selenite (at concentration of: 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.6 mg/kg) or Brazil nut (with two different content: 0.02 and 0.04 mg/kg). The total fungi count and strain proliferation behavior and AFL production were evaluated after 14 days at 28°C for each Se concentration medium. The aflatoxins were analyzed by TLC (LOQ=1.95 ug/kg) and Se by ICP-OES (LOQ=2.0 mg/kg). As the Se concentration increased in the PDA media, the AFL formation by the *A. flavus* reference strain levels decreased. The higher AFL production was in PDA+Se media at concentration 0.1mg/kg with 102.6 ug/kg and no aflatoxin was detected at 0.6 % of Se. Only in the Brazil nut medium from Eastern the strain produced aflatoxin (50.5 µg/kg for total). In mycological analysis, as far as the Se role on aflatoxin production by the toxigenic strain of *A. flavus* are concerned, growth in Brazil nuts was inhibited in higher Se content medium (0.6 mg/kg) but in low concentrations (0.01 mg/kg) it was the highest diameter of the colonies with 19 cm, but no aflatoxin detected. Further studies need to be carried out to evaluate the behavior of other strains in different concentrations of Se to answer the question: is there a connection between aflatoxin and Se in Brazil nuts?

Key Words: aflatoxin, *Bertholletia excelsa*, fungi stress, *Aspergillus*.

6.2 Introduction

Brazil nuts (*Bertholletia excelsa*) are considered a high nutritious food. Apart from carbohydrates, lipids, sulfur proteins and minerals, Brazil nuts are known to be rich in Se (Barclay et al., 1995; Coutinho et al., 2002). Despite of that, when their shell are cracked either when pods fall on the ground, or during pod opening for nut extraction (done by an axe) and exposed to high moisture and temperature of the tropical forest, fungi may grow, spoiling the nuts and if they are toxigenic, producing aflatoxins (AFLs).

Se has been reported to be an antioxidant and studies have reported differences on its levels in Brazil nuts from the two Amazon regions being the Eastern nuts richer in Se than the Western (Chang et al 1995; Pacheco and Scussel, 2007). Its content may vary when grown in different soils of the Amazon basin.

The aflatoxigenic *Aspergillus* species of *A. flavus* and *parasiticus* are intimately related to agricultural crops, including tree nuts and their growth are influenced by environmental conditions. However, less is known about populations of *A. flavus* on Brazil nuts or how they grow and vary among the two Amazon regions; the different stages of nut collection prior reaching the factory and how the processing affect them. Although Brazil nuts have tested positive for these fungi (Castrillon and Purchio, 1988; Freire et al., 2000; Caldas et al., 2002) the origin and extent of involvement of these fungi during harvest and process are relatively unknown. However, AFLs have been reported contaminating Brazil nuts. Brazil nut pods are harvested after they have fallen to the forest ground. They stay directly in contact with the soil for several days to weeks prior to collection. It is during this time that pods become contaminated with *Aspergillus* sp. In addition post harvesting operations are expected to have major influence on further contamination of the nuts (Bayman, 2002).

Se have been used in microbiological media to understand the effect of sodium selenite in different concentrations, in Czapek Dox agar medium, to evaluate the *A.*

parasiticus behavior concerning morphological growth and toxin production. In that data the growth of the fungus decreased by the increasing of the metal concentration (Zohri et al., 1997). In an experiment carried out by Li, Guo and Li (2003) utilizing sodium selenite, Se has stimulating or toxic on organisms depending on the Se levels in media.

In fact, that toxin is produced by *Aspergillus flavus* and the Amazon forest has conditions for that fungus to grow and the Se varies among the regions. It has high temperatures ($> 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) and relative humidity (RH) $> 80\%$ (Bayman et al., 2002; Freire and Offord, 2002; Cartaxo, et al, 2003; EMBRAPA/PAS, 2004; Scussel, 2004; Arrus et al., 2005a; Arrus et al, 2005b; Pacheco and Scussel, 2006).

Considering that Brazil nut are rich in Se, its concentration may vary among regions and AFL contamination has been reported on Brazil nuts, a work was carried out in order to evaluate the effect of Brazil nut Se content on an aflatoxigenic *A. flavus* reference strain in terms of (a) fungal growth behavior, (b) colonies characteristics and (c) aflatoxin production.

6.3 Material and Methods

Material

(a) *Brazil nuts*: two samples (1 kg) of raw, medium size nuts, collected from the Brazilian Amazon basin with 18.4 mg/kg and 43.5 mg/kg Se content (1 kg each). Nuts were previously tested for AFL - no AFL was detected up to the method limit of detection (LOQ) of $1.95\text{ }\mu\text{g/kg}$.

(b) *Toxigenic Aspergillus strain*: high aflatoxigenic (AFB₁: 90.3 and total aflatoxins: 109.2 $\mu\text{g/kg}$) *A. flavus* reference strain (FC1087), supplied by the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Manaus, AM, Brazil.

(c) *Culture media*: aqueous tween 80 and Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck).

(d) *Selenium for (d.1) standard ICP analysis*: sodium selenite (Na₂SeO₃) acidified aqueous solution, prepared with nitric acid at 10 % (certificate N° SRM 3149), NIST and for (d.2) *mycological study (Se media preparation)*: sulfuric acid and Na₂SeO₃ (Analytical grade), Baker. Se solutions were prepared from a stock solution (100

µg/mL) with H₂SO₄ at 10% to obtain the following concentrations: 0.01; 0.02; 0.1; 0.2; 0.4 and 0.6 % in the PDA plates.

(e) *Aflatoxin standards*: AFB₁, AFB₂, FG₁ and AFG₂, Sigma.

(f) *Chemicals*: acetonitrile and methanol (HPLC grade). Ultra water (Mili-Q), Milipore. Ammonium acetate, ammonium sulfate, hydrochloric acid, nitric acid and anhydrous sodium sulfate (Analytical grade), Baker.

(g) *Equipment for (g.1) Se analysis*: atomic emission spectrophotometer (inductively coupled plasma-ICP), Model Otima 2000, Perkin Elmer and for (g.2) *Aflatoxins analysis*: ultra violet cabinet, Tecnal; spectrophotometer, Hitachi; bacteriological oven and autoclave, Fanem and colony counter, Marconi.

(h) *Other materials*: sterilized stainless steel blenders and scissors; thin layer chromatographic aluminum sheets (20 x 20) with G60 silica gel. For sample preparation: sterilized bags (20 kg), stainless steel trays (400 x 250 mm); industrial Brazil nut cracker, CIEX and Petri dishes; Neubauer counting chamber.

Methods

(a) *Brazil nut preparation*: 1 kg of in-shell Brazil nuts of each Se content after de-shelling was finely grounded (particle size <1000 µm), homogenized and three portions of 250 g were separated for (a.1) Se, (a.2) aflatoxin analysis and (a.3) mycology tests, in duplicate.

(b) *Selenium and AFLs (b.1) Se*: nuts were analyzed by inductive coupled plasma (ICP), using atomic emission method (US EPA, 1996). The Se method limit of detection (LOD) was 2.00 µg/g and the LOQ was 3.50 µg/g. (b.2) *AFL*: by AOAC (2005) with a method LOQ for total AFLs of 1.95 µg/kg.

(b) *Media preparation*: they were prepared utilizing PDA (500ml) as basis for the addition of the (b.1) *Se (as sodium selenite) solutions* or (b.2) *ground Brazil nuts with two different Se content*. For (b.1) sodium selenite 6 concentrations in PDA (200 ml) were prepared as in (2.1.d.2). The Se five different concentrations were added in the plates (20 ml) to obtain 0.01; 0.02; 0.1; 0.2; 0.4 and 0.6 mg/kg in the plates and for (b.2) the PDA with the two Se concentration Brazil nut media were prepared utilizing 5 g of each Brazil nut sample in 200 ml of media to obtain a Se concentration of 0.044 and 0.018 mg/kg in the plates, respectively. See PDA Se concentration in Table 1. The portions for mycological tests were sterilized by autoclavation for 15 min at 121°C.

(d) *Spore suspension preparation*: spore suspension of *A. flavus* was standardized using a Neubauer counting chamber, by diluting the reference strain original suspension in aqueous tween 80 in order to get a final concentration of 3.0×10^7 spores/mL. A straight wire was used to give a single point inoculation in the plate center, to evaluate the colony diameter. To observe the colony behavior, the spore suspension of the organism was inoculated by spread plate. The plates were incubated for 14 days at 28°C.

(e) *Total count*: the suspension was spread on the PDA plates previously prepared by adding amounts of a sterilized solution of sodium selenite to obtain 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mg/kg on the plates, and so for the two ground Brazil nuts solutions. The plates were divided into 3 Groups as follows: Group I (PDA containing Se solutions at 6 concentrations); Group II (PDA containing ground Brazil nuts at 2 SE levels) and Group III (as control containing only PDA to evaluate the strain normal behavior). See Table 1. They were incubated for 5 days 28 °C. After that period the total colonies were counted utilizing a Colony Counter.

(f) *Single point inoculation*: the spore suspension was inoculated on the media, previously prepared in (2.2.b). A straight wire was used to give a single point inoculation in the plate center, to evaluate the colony features. Group I: PDA containing Se solutions at 6 concentrations; Group II: PDA containing ground Brazil nuts at 2 SE levels and Group III: as control containing only PDA to evaluate the strain normal behavior. After fungi inoculation, plates were incubated for 14 days at 28 °C.

(g) *Effect of Se on A. flavus growth and AFL production*: The strain growing behavior and toxin production related to Se concentration were evaluated. Fungi growth was recorded every day by counting the colonies, measuring their radius, examining their morphological changes and the reverse color. At the end of the incubation period, it was carried out total fungi count and the final morphological colonies features (size, color, shape, reverse color and fluorescence under UV light following the Zohri, et al. (1997) procedure.

(e) *Strain aflatoxigenicity*: each media with the *A. flavus* strain colonies had aflatoxin extracted and analyzed as in (2.2.b.2).

(h) *Statistical analysis*: the data were analyzed using analysis of variance (ANOVA).

6.4 Results and Discussion

The data obtained showed differences on the *A. flavus* strain proliferation and aflatoxin production when inoculated in PDA media enriched with sodium selenite at the 6 concentrations or with ground Brazil nuts from the Eastern and Western Amazon regions containing two different Se content (Table 2).

Effect of selenium content on the total fungi count growth: as far as the total *A. flavus* count in the different Se concentration PDA plates, it was observed that the highest count (1.5×10^6 cfu) was obtained when the strain grew in the media containing the lowest Se concentration, then decreasing the fungi colonies number from that concentration up to 3.0 mg of Se/kg, where no fungi was able to growth. The Se concentration that presented still some fungi growth (0.9×10^6 cfu) was the previous one, at 0.4 mg/kg level. Similarly, when the ground Brazil nuts solution was added to the PDA media, the total fungi count was 2.3×10^6 and 1.2×10^6 cfu for the Western (0.02 mg/kg in the plate) and Eastern (0.04 mg/kg in the plate) precedence, respectively. Figure 1 shows the *A. flavus* total count from Day Zero to Day 5 in the Brazil nuts media from both regions. The amount of Se from the two regions nuts in the media were two fold high for Eastern and that make a lot of difference when looking at the fungi grow intensity. As far as the control plate in concerned, it was found 2.8×10^6 cfu, similarly to the findings of Candlish et al. (2001) to *flavus* isolate of 1.64 to 2.9 mycelia (g/100ml).

Effect of Selenium content on Aspergillus flavus colony features: When *A. flavus* strain was inoculated in a single point on PDA media containing the 6 different Se concentrations and Brazil nut Se two concentration, it was possible to observe the colony features such as their diameter variations, colors as well as reverse color and fluorescence. Their diameters increased with the reduction of Se concentration in the media. With the highest diameter in the Brazil nut W. media with 31.5 mm. green color except for the ones grown in 0.05 MG Se in the media. They presented a white broad non sporulating margin. On the other hand, the reverse color changed from brown to orange-red with the Se concentration increasing in the media. And all media, despite of the Se concentration presented fluorescence of the AFL except for 3.0 mg/kg, and so the aflatoxins formation as Fig 1 and Table 2 show.

Effect of selenium content on aflatoxin formation: aflatoxins were produced by all media containing Se, despite of Se form either in the Brazil nuts or the sodium selenite, except for the highest concentration (3.0 mg/kg) as no *A. flavus* was able to grow. The same occurred in the Control with $109.2 \pm 0.2 \mu\text{g/kg}$. The AFB₁ production decreased as the Se levels increased. For total toxins formation, it was observed that, at the two first Se concentrations fungi was able to produce high amount of aflatoxins similar to the Control ca. $100 \mu\text{g/kg}$.

Primarily, the *Aspergillus flavus* behavior was dose-dependent of the Se concentrations and AFL synthesis as well (Table 2). From 0.25 to 0.50 mg of Se/kg media, Se seems to play the effect of improving the strain development with 3 days as well the Brazil nut, Western precedence, and no AFL production. These results are confirmed in other experiments (Geyikoglu and Turkez, 2006) where sodium selenite was recognized as antimutagenic and anticarcinogenic against the toxicity and genotoxicity of AFB₁ and apparently Se might be affecting as an antioxidant. This protective effect has been reported to be primarily associated with the presence in glutathione peroxides, which are known to protect DNA and other cellular components from damage by oxygen radicals. In concentrations of 8mg/kg, Se has been found as an active inhibitor of mutagenicity of AFG1 as observed with AFB₁, probably related to its action on the enzymatic activation system since Se is essential component of glutathione peroxides (Agar and Alpsoy, 2005), this ability was confirmed also in human whole blood cultures, confirming the protective effect of sodium selenite in concentrations of $5 \times 10^{-7} \text{M}$ (Geyikoglu and Turkez, 2006).

The efficacy of Se in media with higher concentration of Eastern tested, demonstrated that was effective to delay the growth but supported the AFL production, against West media that improve the fungi growth but not the AFL. It can be explained because Se tolerance and detoxification by microorganisms involves microbial transformation of inorganic Se (more toxic) to volatile organics (less toxic) and reduction of Se oxyanions, selenite and selenate to inert elemental Se, with needs of extended time for these reactions to occur. The toxic action of Se in fungi is believed to be due to incorporation into protein amino acids instead of sulfur which can lead to altered tertiary structure and dysfunction of proteins and enzymes. In

some fungi systems Se has demonstrated a coincidence of decreased toxicity with Se cellular decreased (Gharieb and Gadd, 1998).

The *Aspergillus flavus* strain was inoculated in different culture media containing different Se concentrations to evaluate in basis of fungal growth, colonies characteristics and in terms of total fungal count and AF production, based in previously experiment that sodium selenite has either stimulation or toxic effects on organisms depending on the Se levels in media (Li, Guo and Li, 2003). Sodium selenite concentrations below 400 mg/L were found to stimulate algal growth, especially in the range of 0.5-40 mg/L. However, above 500 mg/L, sodium selenite was toxic to the alga with toxicity being related to the sulfite level in the medium. On the other hand, *Spirulina platensis* was found to resist higher selenite by reducing toxic Se (IV) to nonsoluble Se(0), as well as accumulating selenium during cultivation, with the increase of the selenite concentration in the media.

6.5 Conclusion

Once Western area demonstrated lower values of those parameters, it could be explained for the toxicity of high amounts of Se in organisms, and maybe causing oxidative stress in fungus. As an example, the oxidative stress is a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* (Jayashree and Subramanyam, 2000). Thus, the Se amounts could develop the mechanisms of aflatoxin production and contaminating Brazil nuts at the first storages. Bronzetti *et al* (2001) demonstrated Se compounds in yeasts exerted both mutagenic and antimutagenic effect at different concentrations. On the other hand, other factor, such as the interaction or the competition with different strains of *Aspergillus* seems to affect the increasing of AFL production in some substrates as well (Martins, Martins, Bernardo, 2000) and need to be investigated.

6.6 Literature Cited

- Agar, G., Alpsoy, L., 2005. Antagonistic effect of selenium against aflatoxin G₁ toxicity induced chromosomal aberrations and metabolic activities of two crop plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 46: 301-305
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th, Horwitz, W. and Latimer, G. W. Jr. eds. Gaithersburg, Maryland, USA.

- Arrus, K., Blank, G., Clear, R. & Holley, R.A. 2005a. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *J. of Stored Products Research*, 41, 513-527.
- Arrus, K., Blank, G., Clear, R., Holley, R.A. & Abramson, D. 2005b. Microbiological and aflatoxin evaluation of Brazil nut pods and the effects of unit processing operations. *J. of Food Protection*, 68(5), 1060-1065.
- Bayman, et al., 2002. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia* 155:161-169.
- Barclay, M.N.I., McPherson, A. and Dixon, J. 1995. Selenium content of a range of UK foods. *J. of food composition and analysis*. 8, 307-318.
- Brazil, 1968. Brazil. Ministry of Development, Industry and Commerce. Dec. L. n°356, Art. 1° § 1, from 15/08/1968. 1968.
- Bronzetti, G., Cini, M., Andreolli, E., Caltavuturo, L., Panunzio, M. and Croce, C.D. 2001. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. *Mutation research*. 496: 105-115.
- Caldas, E. Silva, S. C. and Oliveira, J.N. 2002. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. *Rev. S. Publica*. 36:319-323.
- Candlish, A. et al. 2001. A survey of ethic foods for microbial quality and aflatoxin content. *Food addit. and Contaminants*, v18, n°2, p.129-136.
- Castrillon, A.L. and Purchio, A. 1988. Aflatoxin occurrence in Brazil nuts. *Acta amazonica*, 18, 49-56.
- Chang, J.C., Gutenmann, W.H., Reid, C.M. and Lisk, D.J., 1995. Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil. *Chemosphere*. V. 30, 801-802, 1995.
- Coutinho, V.F., Bittencourt, V.B. & Cozzolino, S.M.F. 2002. Effects of supplementation with Brazil nuts (CP, *Bertholletia excelsa* H.B.K.) in capoeira players on selenium (Se) concentration and glutathione peroxidases activity (GSH-PX, E.C.1.11.1.9). In: trace elements in man and animal. Springer ed., Part II.
- Campo/PAS. 2003. Manual of quality and food safety for the Brazil nut. *Projeto PAS Campo*, Brasília: Embrapa/Sede., 69p.
- EU - European Union, 1998. Commission Regulation 1525/98 of 16 July 1998, amending Regulation (EC) N. 194/97 of January 1997 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuff. Official Journal of European Communities./33-38 , 5/7/2003.
- Freire, F.C.O., Kozakiewicz, Z. and Paterson, R.M., 2000. Mycoflora and mycotoxins in brazilian black pepper, white pepper and Brazil nuts. *Mycopathologia*, 149, 13-19.
- Geyikoglu F., Turkez, H. 2006. Protective effect of sodium selenite against the genotoxicity of aflatoxin B₁ in human whole blood cultures. *Braz. arch. biol. technol.*, 49:393-398.
- Gharieb, M., Gadd. G. 1998. Role of glutathione in detoxification of metal(loid)s by *Saccharomyces cerevisiae* *BioMetals*. 2: 183:188.
- Jayashree, T., Subramanyam, C. 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free radical biology & medicine*, v.29, N.10, 981-985.
- Letavayová, L., Vlcková, V. and Brozmanová, J., 2006. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*, 227, 1-14.
- Li. Z. Guo, S., Li, L. 2003. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technology*, 89: 171-176
- Martins, H.M., Martins, M.L. and Bernardo, F.A. (2000). Interaction of strains of non-toxicogenic *Aspergillus flavus*, with *Aspergillus parasiticus* of Aflatoxin production. *Braz. J. vet. Res. Anim Sci*, v.37.n.6.
- NAS- National Academy of Sciences (US) (2000) In: Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Disposable in <http://www.nap.edu/catalog/9810.html>. Accessed in 04/23/07.
- Pacheco and Scussel. 2007. Selenium and Aflatoxin Levels in Raw Brazil Nuts from the Amazon Basin. *J. of Agric.and Food Chemistry*. In press.
- Pacheco, A.M. and Scussel, V.M. 2006. *Brazil Nut: From Tropical Forest to Consumer*. Editograf. 173pp.
- Scussel, V.M. (2004). Aflatoxin and food safety: Recent South American Perspectives. *J. of Toxicology. Toxin Reviews*, 23(2 & 3):179-216.

- Souza, M. L., Menezes, H. C. 2004. Processing of Brazil nut and meal cassava flour: quality parameters. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, nº 01, 120-128.
- US EPA- United States Environmental Protection Agency (EPA). 1996. "Method 6010B: Inductively Coupled plasma-atomic emission spectrometry." *SW-846 test methods for evaluating solid wastes, physical/chemical methods*.
- Valko, M., Rhodes, B.C, Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40.
- Zohri, A.A., Saber, S.M. and Mostafa, E., 1997. Effect of selenite and tellurite on the morphological growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus* var. *globosus* IMI120920. *Mycopathologia*, 139:51-57.

Table 1- Culture media utilized for the Se effect on fungi stress study with different Se concentrations

Group	PDA ^a media ^b	Se ^c concentration ^d (mg/kg)
I	Se (mg/kg)	0.60
		0.40
		0.20
		0.10
		0.02
		0.01
II	Brazil nut ^e Eastern	0.04
	Western	0.02
III	Control NS ^f	NA ^g

^a Potato dextrose agar ^b 20 ml in each petri dish ^c Selenium ^d in the plate
^e Brazil nut sample Se content: 43.5 and 18.4 mg/kg ^f No selenium added ^gNot applicable
+ Na₂SeO₃

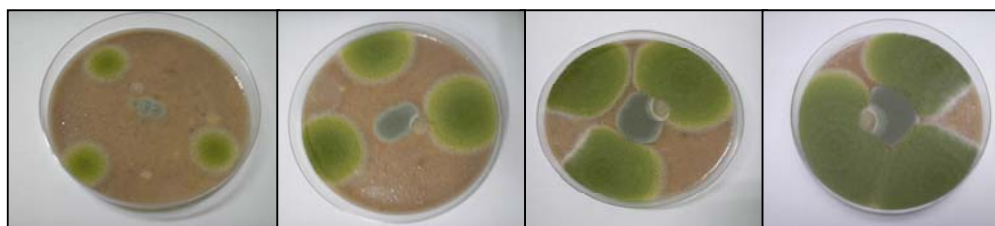
Table 2. Evaluation of aflatoxigenic *A. flavus* reference strain behavior incubated in different Se concentrations and Brazil nuts Se content

Media		Fungi count (cfu/ml)	Colony features				Aflatoxin (µg/kg)	
Group	Composition (PDA ^a +Se)		Diameter ^c (mm)	Colour	Reverse	Fluorescence ^j	Total [*]	AFB1 ^{**}
I	Selenium ^b (mg/kg)							
	0.05	1.5 x 10	19±4 ^d	Green ^e	Brown	+	98.7±0.3	75.0±0.5
	0.10	1.3 x 10	13±4	Green	Brown	+	102.6±0.3	70.4±0.2
	0.50	1.3 x 10	10±3	Green	Light brown	+	90.3±0.5	67.9±0.3
	1.00	1.1 x 10	9±2	Gray	Orange red	+	70.3± 0.5	49.2±0.5
	2.00	0.9 x 10	5±2	Gray	Orange Red	+	30.6±0.5	19.2±0.5
	3.00	None	NG ^f	NA ^g	NA	-	NA	NA
II	Brazil nuts (mg/kg)							
	Eastern ^h 0.04	1.2 x 10	18±2	Green ^e	Orange Red	+	50.2±0.6	28.5±0.6
	Western ⁱ 0.02	2.3 x 10	31±5	Green ^e	Colourless	+	ND	ND
III	Control							
	NS	2.8 x 10	30.5±5 ^f	Green	Colourless	Fluorescence	109.2 ±0.2	90.3±0.5

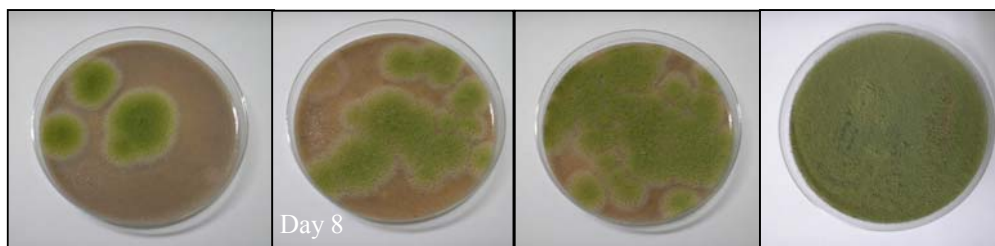
^a Potato dextrose Agar^b Na₂SeO₃ in PDA medium^c the values of colony diameter are means standard deviation based on two replicates.^d standard deviation^ewith white broad nonsporulating margins^f No fungi growth^g Not applicable^h PDA+ BN: Se mg/kg concentrations: Eastern: 50.9 ng.g⁻¹ and Western: 13.2 mg/kg of Se.ⁱ PDA+ BN: Se mg/kg concentrations: Eastern: 50.9 ng.g⁻¹ and Western: 13.2 mg/kg of Se.^j under ultra violet light at 365 nm

* Σ total AFL LOD: 0.390 µg./kg

** AFB₁ LOD: 0.04 µg/kg

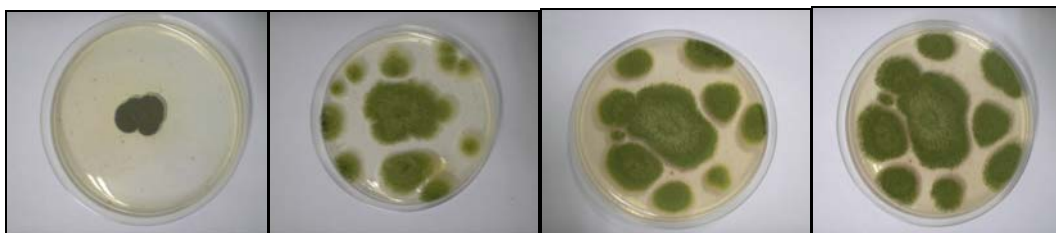


(a) PDA media with Brazil nut from Eastern Amazon Basin (Se content: $43.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

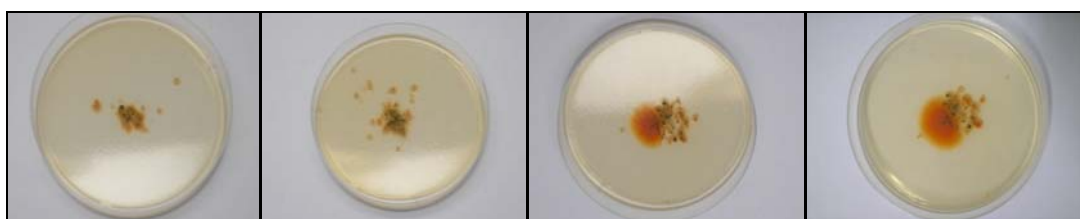


(b) PDA media with Brazil nut from West Amazon Basin (Se content: $18.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Fig 1. Toxigenic *A. flavus* (FC1087) strain growth during 14 days of incubation at 28°C in PDA media containing Brazil Nut with different Se concentration: nuts from the (a) Eastern and (b) Western Amazon regions (*spreading technique*)



(a) PDA media with Se: 0.5 µg.g⁻¹



(b) PDA media with Se: 3.0 µg.g⁻¹

Fig 2. Toxigenic *A. flavus* (FC1087) strain growth during 14 days of incubation at 28°C in PDA media containing different Se concentration as Na₂SeO₃ (a) 0.5 and (b) 3.0 µg.g⁻¹ (*single point technique*).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de a presença de AFLs e castanha-do-Brasil ser real, a heterogeneidade desta ocorrência demonstra que diversos fatores, podem agir isoladamente ou em associação para determinar as condições ideais de produção das AFLs, ou que suas características físico-químicas ou organolépticas sejam alteradas negativamente.

As condições ambientais em toda a cadeia produtiva são extremamente dinâmicas a cada safra, e os controles aplicados em caráter preventivo têm papel fundamental em diminuir a possibilidade da instalação do fungo e produção da toxina, que demonstra ter alta ocorrência mesmo nas etapas anteriores ao beneficiamento.

Além da contaminação, o alto teor de Selênio com caráter antioxidante pode constituir fator benéfico quanto ao combate à contaminação. Entretanto, outras propriedades deste e de outros de sua composição, têm necessidade de ser avaliados, de forma que seus níveis não se tornem tão ambíguos ao ponto de causar risco à saúde do consumidor. Mesmo na presença de compostos naturalmente antioxidantes, as aflatoxinas atingem a castanha-do-Brasil beneficiada, sugerindo a necessidade de estudos que utilizem mecanismos tecnológicos, como a atmosfera modificada na ampliação da vida-de-prateleira de seus produtos derivados, que podem estar sujeitos a deterioração lipídica e por utilizarem, em alguns casos, outros ingredientes, também susceptíveis a contaminação fúngica.

As propriedades nutricionais e antioxidantes da castanha-do-Brasil parecem necessitar de monitoramento contínuo quanto a habilidade de afetar a sua qualidade e o impacto que podem causar tanto na saúde do consumidor, quanto no âmbito comercial. Desta forma, observa-se que os dados obtidos podem ser úteis para subsidiar a busca de outros mecanismos de melhoria da cadeia produtiva da castanha-do-Brasil, de forma a contribuir na manutenção desta atividade tão importante aos povos da Amazônia.

ANEXOS

PADRONIZAÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO INTERNA DA CASTANHA-DO-BRASIL
(Brasil, 1976)

Especificações para padronização, classificação e comercialização interna da Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), aprovadas pela portaria Ministerial nº 846 de 08 de 11 de 1976, em observância ao disposto no artigo 39, Ministério da Agricultura, item VIII, do Decreto-Lei nº 200, de 25 de fevereiro de 1967, e com vistas ao que prescreve o art. 1º do Decreto nº 69.502, de 05 de novembro de 1971.

DA PADRONIZAÇÃO

Art. 1º. A castanha do Brasil, conhecida no mercado internacional como *Brazil nuts* ou *noix du Brésil*, semente do castanheiro (*Bertholletia excelsa* H.B.K.), da família das Lecythidáceas, será classificada em grupos, subgrupos, classes e tipos, segundo sua forma de apresentação, preparo ou manipulação, tamanho e qualidade.

DOS GRUPOS E SUBGRUPOS

Art. 2º. A castanha do Brasil, segundo sua forma de apresentação, será ordenada em 2 (dois) grupos, assim denominados:

I – Castanha em Casca: É o produto que se apresenta no estado que foi colhido, extraído ou ouriço, limpo e seco naturalmente ou por processo de desidratação adequada.

II – Castanha Descascada ou Beneficiada: É o produto limpo, seco e são, que por processos tecnológicos adequados, teve retirada sua casca.

Art. 3º. A castanha em casca, segundo o seu preparo ou processo de manipulação, será classificada em 3 (três) subgrupos:

I – Natural: É o produto “in natura”, sem ter sido submetido a qualquer processo de desidratação artificial, apenas limpo e seco naturalmente.

II – Desidratado: É o produto que foi submetido simplesmente ao processo artificial de desidratação, teve o seu teor de umidade compreendido entre 11% (onze por cento) e 15% (quinze por cento), no máximo.

III – Desidratado Polido: É o produto que, depois de desidratado, foi submetido ao processo de polimento, objetivando melhoria de sua apresentação e conservação.

Art. 4º. A castanha descascada ou beneficiada, segundo seu preparo ou processo de manipulação, será classificada em 2 (dois) subgrupos:

I – Amêndoa com Película: É o produto que se apresenta total ou parcialmente revestido de película.

II – Amêndoa sem Película: (Brancheada): É o produto que, após ter sido submetido a processo químico, se apresenta totalmente desprovido de película.

DAS CLASSES

Art. 5º. A castanha em casca, quando “in natura”, do subgrupo Natural, será classificado segundo o seu tamanho, caracterizado pelo número de unidade/castanha por 453 gramas, em 6 (seis) classes:

I – Extra Grande (extra-large): É o produto que contiver menos de 36 unidades/castanha por 453 gramas.

II – Grande (large): É o produto que contiver de 36 a 40 unidades/castanha por 453 gramas.

III – Semigrande (weak-large): É o produto que contiver de 41 a 45 unidades/castanha por 453 gramas.

IV – Extra Média (extra-medium): É o produto que contiver de 46 a 50 unidades/castanha por 453 gramas.

V – Média (medium): É o produto que contiver de 51 a 58 unidades/castanha por 453 gramas.

VI – Pequena (small): É o produto que contiver acima de 58 unidades/castanha por 453 gramas.

Art. 6º. A castanha em casca dos subgrupos Desidratado e Desidratado Polido será classificada segundo seu tamanho, caracterizado na forma do artigo anterior, em 6 (seis) classes:

I – Extra Grande (extra-large): É o produto que contiver menos de 46 unidades/castanha por 453 gramas.

II – Grande (large): É o produto que contiver de 46 a 50 unidades/castanha por 453 gramas.

III – Semigrande (weak-large): É o produto que contiver de 51 a 55 unidades/castanha por 453 gramas.

IV – Extra Média (extra-medium) É o produto que contiver de 56 a 62 unidades/castanha por 453 gramas.

V – Média (medium): É o produto que contiver de 57 a 68 unidades/castanha por 453 gramas.

VI – Pequena (small): É o produto que contiver acima de 68 unidades/castanha por 453 gramas.

Art. 7º. A castanha descascada ou beneficiada dos Subgrupos Amêndoa com Película e Amêndoa sem Película (Brancheada) será classificada segundo seu tamanho, caracterizado na forma do disposto no artigo 5º e, simultaneamente, de acordo com a natureza a que for o produto enquadrado (inteira, ferida ou quebrada), em 8 (oito) classes:

I – Miudinha (tiny): É o produto que contiver acima de 180 unidades/amêndoa por 453 gramas.

II – Miúda (midget): É o produto que contiver de 160 a 180 unidades/amêndoa por 453 gramas.

III – Pequena (small): É o produto que contiver de 140 a 159 unidades/amêndoa por 453 gramas.

IV – Média (medium): É o produto que contiver de 115 a 139 unidades/amêndoa por 453 gramas.

V – Extra Média (extra-medium): É o produto que contiver de 102 a 114 unidades/amêndoa por 450 gramas.

VI – Grande (large): É o produto que contiver menos de 102 unidades/amêndoa por 453 gramas.

VII – Ferida (chipped): É o produto que se apresente com as amêndoas lascadas e/ou mutiladas por escoriações, oriundas de agente físico.

VIII – Quebrada (broken): É o produto que apresenta com as amêndoas fragmentadas, partidas e/ou quebradas.

DOS TIPOS

Art. 8º. A castanha em casca será classificada, segundo a qualidade, respeitado o subgrupo e a classe a que pertencer, em um único tipo; constituído de castanhas perfeitamente desenvolvidas, de cor natural; de tamanho e uniformidade correspondentes à classe a que forem enquadradas; limpas; secas, em boas condições de sanidade e isentas de matérias estranhas.

Tolerância: Máximo de 10% (dez por cento) de castanhas danificadas e/ou defeituosas, e 2% (dois por cento) de impurezas próprias do produto para a castanha natural; sendo, quando desidratada e desidratada polida, de 7% (sete por cento) e 1% (um por cento), no máximo, respectivamente.

Art. 9º. A castanha descascada ou beneficiada será classificada, segundo a qualidade, respeitado o subgrupo e a classe a que pertencer, em um único tipo: constituído de amêndoas de cor natural; de tamanho e uniformidade

correspondentes à classe a que forem enquadradas, em boas condições de sanidade; livre de amêndoas rancificadas, e isentas de matérias estranhas.

Tolerância: Máximo de 1% (um por cento) de impurezas próprias do produto.

Parágrafo único – As amêndoas das Classes VII (Ferida) e VIII (Quebrada) serão respectivamente classificadas, segundo a qualidade, respeitado o subgrupo a que pertencer, em um único tipo: constituído de amêndoas, correspondentes à classe a que forem enquadradas, de cor natural, em boas condições de sanidade, livre de amêndoas rancificadas e isentas de matérias estranhas.

Tolerância: Máximo de 2% (dois por cento) de impurezas próprias de produto, inclusive resíduo e/ou pó.

ABAIXO DO PADRÃO

Art. 10. A castanha de qualquer grupo, respeitados os respectivos subgrupos e as respectivas classes, que pelos seus atributos não se enquadrar no tipo descrito, será considerada Abaixo do Padrão, desde que se apresente em bom estado de conservação.

§ 1º. A castanha assim classificada poderá, conforme o caso, ser rebeneficiada ou submetida à secagem, para efeito de se enquadrar no tipo descrito, observando os artigos 8º, 9º e 10.

§ 2º. É permitido, quando no ato da inspeção e de rebeneficiamento ou secagem do produto, a recomposição (loteamento) e o desdobramento dos lotes.

§ 3º. Deverão constar, obrigatoriamente, no Certificado de Classificação, os motivos que deram lugar à denominação Abaixo do Padrão.

DESCCLASSIFICAÇÃO

Art. 11. Será desclassificada a castanha de qualquer grupo que apresente:

- a). Mau estado de conservação;
- b). Aspecto generalizado de mofo e/ou fermentação;
- c). Odor estranho de qualquer natureza, impróprio ao produto, prejudicial a sua utilização normal;
- d). Presença de insetos vivos.

Parágrafo Único - Serão declarados, obrigatoriamente, no Certificado de Classificação, os motivos que deram lugar a Desclassificação.

Art. 12. Toda a castanha em que for verificada a presença de insetos vivos, só poderá ser comercializada depois de expurgada, medida esta prescrita pela autoridade fitossanitária competente, que expedirá o respectivo Certificado, respeitada a legislação vigente.

DA AFLATOXINA

Art. 13. Quando exigido em cláusula contratual, a castanha, de qualquer grupo, só poderá ser comercializada internamente, mediante apresentação do certificado de isenção de aflatoxina.

Parágrafo único - Será considerado isento de aflatoxina o produto que presença dessa toxina até um limite máximo de 50 p.p.b. (cinquenta partes por bilhão).

DA AMOSTRAGEM

Art. 14. A retirada ou extração de amostra será procedido do seguinte modo: a). Nos lotes de castanha em casca natural, quando à granel, far-se-á extração de amostra do alto, do meio e das laterais do lote ou tulha, em quantidade que represente a totalidade de castanha a ser classificada, nunca inferior a 10 (dez) quilograma por tonelada do produto.

b). Nos lotes de castanha em casca natural ou desidratada, quando ensacada, far-se-á extração de amostra ao acaso, em quantidade mínima correspondente a 10% (dez por cento) do total do lote a ser classificado.

c). Nos lotes de castanha descascada ou beneficiada (amêndoa) encaixotada, far-se-á extração de amostras, obedecendo ao seguinte critério:

Lote de até 5 (cinco) caixas: amostra média de 1 (uma) unidade (caixa);

Lote de 6 (seis) a 100 (cem) caixas: 10% (dez por cento) do lote, com um mínimo de 5 (cinco) unidades (caixa);

Lote acima de 100 (cem) caixas: 5% (cinco por cento) do lote, com um mínimo de 10 (dez) unidades (caixa).

DA ANÁLISE

Art. 15. As amostras extraídas segundo os processos descritos no artigo anterior, serão homogeneizadas, divididas em 3 (três) ou mais exemplares com o peso mínimo de 500 (quinhentos) gramas cada, as quais serão acondicionadas em saquinhos de papel, plástico ou similar, devidamente identificadas, sendo 2 (duas) destinadas, obrigatoriamente, ao órgão classificador.

Parágrafo Único – Para fins de fiscalização, a extração de amostra e sua embalagem serão idênticas ao estabelecido nos artigos 14 e 15.

DA EMBALAGEM E MARCAÇÃO

Art. 16. A castanha em casca, quando não embarcada a granel, e a castanha descascada ou beneficiada (amêndoa), deverão ser acondicionadas em embalagens apropriadas e em lotes uniformes.

§ 1º - No caso específico de castanha descascada ou beneficiada (amêndoa), seu acondicionamento deverá simultaneamente ser feito mediante injeção de gás inerte na respectiva embalagem, objetivando preservar a conservação do produto.

§ 2º - As embalagens avariadas durante o transporte deverão ser substituídas ou reparadas com material idêntico.

§ 3º - A embalagem de castanha será obrigatoriamente marcada de acordo com a legislação específica em vigor.

§ 4º - A marcação de embalagem será procedida mediante o emprego de tintas que não afetem sua qualidade.

DO AMARZENAMENTO E MAIOS DE TRANSPORTE

Art. 17. O depósito para armazenamento da castanha e os meios para seu transporte devem oferecer plena segurança e condições técnicas imprescindíveis à sua perfeita conservação, respeitadas as exigências da legislação específica vigente.

DA FRAUDE

Art. 18. Considera-se fraude toda alteração dolosa de qualquer natureza praticada não só na classificação e no acondicionamento, como também nos documentos da qualidade da castanha, conforme legislação vigente.

NORMAS GERAIS

Art. 19. As normas e termos adotados nas presentes especificações assim como as características relacionadas com a qualidade da castanha deverão ser observadas e interpretadas do seguinte modo, e de acordo com o apêndice incluso:

Castanha Defeituosa: Castanha em casca, amêndoas e fragmentos de amêndoas que se apresentem carunchados, mofados, rancificados.

Coloração: Cor uniforme e característica do produto.

Corte: Operação que compreende na abertura da castanha em casca, para exame do estado em que se encontra sua amêndoa.

Danificada: Castanha em casca, amêndoas e pedaços de amêndoas que se apresentem com danos causados por agentes biológicos (carunchos, roedores, insetos e outros).

Impurezas: Detritos do próprio produto, tais como haste, pó e casca.

Matérias Estranhas: Detritos de qualquer natureza, estranhos ao produto tais como: areia, fragmentos de madeira, pedra, torrões, sementes estranhas, sujidades, restos de insetos.

Mofada: Castanha em casca, amêndoa e fragmentos de amêndoa, que apresentem, a olho nu, filamentos de fungos.

Odor Estranho: Aroma não peculiar ao produto.

Quebrado: Pedaço ou fragmento de amêndoa, qualquer que seja o seu tamanho.

Rancificada: Amêndoa que apresenta cor anormal, odor e sabor desagradáveis, devido às características físico-químicas do óleo terem se alterado por processo oxidativo.

Teor de Umidade: Percentual de água contida na castanha ou na amêndoa, determinado através de processos reconhecidos oficialmente.

DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 20. O Certificado de Classificação será válido pelo prazo de 90 (noventa) dias para a castanha em casca natural, e de 150 (cento e cinquenta) dias para a castanha em casca desidratada, e descascada ou beneficiada (amêndoa), contados, respectivamente, da data de sua emissão.

Parágrafo Único – Deverão constar do Certificado de que trata o presente artigo a indicação do grupo, subgrupo, classe, tipo e ano da safra a que pertencer o produto, sendo que no caso de mistura de castanha de safras colhidas em anos diferentes prevalecerá a anotação da mais antiga.

Art. 21. As determinações físico-químicas, serão aquelas obtidas em laboratórios devidamente credenciados.

Art. 22. Os métodos de análises para a determinação dos teores de umidade e aflatoxina serão os de validade reconhecido no mercado, tanto interno como externo.

Art. 23. Os casos omissos serão resolvidos pelo órgão técnico competente do Ministério da Agricultura.